

Aus der
III. Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Regulation der Expression des Arginin-Transporters CAT-1
in Zellen der Chronischen Lymphatischen Leukämie:
Analyse wichtiger Signaltransduktionswege

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Niklas Philipp Wildenberg
aus Heppenheim

Mainz, 2021

Wissenschaftlicher Vorstand:

[REDACTED]

1. Gutachter:

[REDACTED]

2. Gutachter:

[REDACTED]

Tag der Promotion:

07. Dezember 2021

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	XI
Abkürzungsverzeichnis	XII
1 Einleitung	1
2 Literaturdiskussion	2
2.1 Chronische Lymphatische Leukämie (CLL)	2
2.2 Arginin und Immunsystem	7
2.3 Aminosäure-Transporter	13
2.4 Signaltransduktionswege in CLL-Zellen	18
2.4.1 Der PI3K/Akt-Signalweg	18
2.4.2 Der NF- κ B-Signalweg	23
2.4.3 Der B-Zell-Rezeptor-Signalweg	29
3 Materialien	34
3.1 Chemikalien	34
3.2 Medien und Medienzusätze	35
3.3 Lösungen und Puffer	35
3.4 Kits	37
3.5 Geräte	38
3.6 Zelllinien	39
3.7 Inhibitoren	39
3.8 Antikörper	40
3.8.1 Primärantikörper	40
3.8.2 Sekundärantikörper	40
3.9 Weitere Materialien für den Western Blot	41
4 Methoden	42
4.1 Methoden der Zellkultur	42
4.1.1 Kultivierung der Zellen	42
4.1.2 Kryokonservierung der Zellen	43
4.1.3 Bestimmung der Zellzahl lebender Zellen	43
4.2 Kultivierung von primären und immortalisierten CLL-Zellen in der Gegenwart von Signalweg-Inhibitoren	43
4.2.1 Ansetzen der Versuchsbedingungen mit HG3-Zellen	43
4.2.2 Ansetzen der Versuchsbedingungen aus den primären CLL-Zellen	44
4.2.2.1 Aufbereitung von tiefgefrorenen CLL-Patienten-Blutproben	44
4.2.2.2 Isolation primärer CLL-Zellen	45
4.2.2.3 Ansetzen der Versuchsbedingungen	45
4.2.2.4 Stimulation primärer CLL-Zellen	45

4.3	Durchflusszytometrie (FACS)	46
4.3.1	Funktionsprinzip der Durchflusszytometrie	46
4.3.2	Probenvorbereitung für die FACS-Messung	46
4.3.3	Immunphänotypisierung (Reinheitskontrolle)	47
4.4	Proteinbiochemische Methoden	48
4.4.1	Isolation von Proteinen	48
4.4.2	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Lowry	48
4.4.3	Glykosidase-Behandlung	49
4.4.4	SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)	49
4.4.5	Western Blot	50
4.4.6	Strippen der Membranen	51
4.5	RNA-Analyse	51
4.5.1	Isolation der RNA	51
4.5.2	RNA-Konzentrationsbestimmung	52
4.5.3	Reverse Transkription (Umschreiben der RNA in cDNA)	52
4.5.4	Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)	53
4.6	Messung der Proliferation der Zellen mit Hilfe des [³H]-Thymidin-Assays	55
4.7	Messung der Stoffwechselaktivität der Zellen mit Hilfe des MTT-Assays	55
4.8	Statistik	56
5	Ergebnisse	57
5.1	Starke Expression von Signaltransduktionsproteinen des PI3K/Akt-, BZR- und NF-κB-Signalwegs in der CLL-Zelllinie HG3	57
5.2	Analyse der Effekte eines Argininmangels auf die CAT-1-Proteinexpression der CLL-Zelllinie HG3	58
5.2.1	Argininmangel hemmt die Viabilität der CLL-Zelllinie HG3	58
5.2.2	Argininmangel induziert die CAT-1-Proteinexpression der CLL-Zelllinie HG3	59
5.3	Analyse der Effekte des Akt-Inhibitors auf die CAT-1-Expression der CLL-Zelllinie HG3	61
5.3.1	Die Inhibition des PI3K/Akt-Signalwegs reduziert die Viabilität der CLL-Zelllinie HG3	61
5.3.2	Die Inhibition des PI3K/Akt-Signalwegs reduziert die Proliferation der CLL-Zelllinie HG3	63
5.3.3	Die Inhibition des PI3K/Akt-Signalwegs reduziert die CAT-1-Proteinexpression der CLL-Zelllinie HG3	64
5.3.4	Die Inhibition des PI3K/Akt-Signalwegs zeigt keinen Einfluss auf die CAT-1-mRNA-Expression der CLL-Zelllinie HG3	66
5.4	Analyse der Effekte des BTK-Inhibitors auf die CAT-1-Expression der CLL-Zelllinie HG3	67
5.4.1	Die Inhibition des BZR-Signalwegs zeigt keinen Einfluss auf die Viabilität der CLL-Zelllinie HG3	67
5.4.2	Die Inhibition des BZR-Signalwegs reduziert die Proliferation der CLL-Zelllinie HG3	69
5.4.3	Die Inhibition des BZR-Signalwegs reduziert die Stoffwechselaktivität der CLL-Zelllinie HG3	70
5.4.4	Die Inhibition des BZR-Signalwegs reduziert die CAT-1-Proteinexpression der CLL-Zelllinie HG3	71
5.4.5	Die Inhibition des BZR-Signalwegs zeigt keinen Einfluss auf die CAT-1-mRNA-Expression der CLL-Zelllinie HG3	73

5.5	Analyse der Effekte des NF-κB-Inhibitors auf die CAT-1-Expression der CLL-Zelllinie HG3	74
5.5.1	Die Inhibition des NF- κ B-Signalwegs reduziert die Viabilität der CLL-Zelllinie HG3	74
5.5.2	Die Inhibition des NF- κ B-Signalwegs reduziert die Proliferation der CLL-Zelllinie HG3	76
5.5.3	Die Inhibition des NF- κ B-Signalwegs reduziert die Stoffwechselaktivität der CLL-Zelllinie HG3	77
5.5.4	Die Inhibition des NF- κ B-Signalwegs zeigt keinen Einfluss auf die CAT-1-Proteinexpression der CLL-Zelllinie HG3	78
5.5.5	Die Inhibition des NF- κ B-Signalwegs zeigt keinen Einfluss auf die CAT-1-mRNA-Expression der CLL-Zelllinie HG3	79
5.6	Analyse der CAT-1-Expression der CLL-Zelllinie HG3 bei Kombination der verschiedenen Inhibitoren	80
5.6.1	Analyse der CAT-1-Expression der CLL-Zelllinie HG3 bei Kombination des Akt- und BTK-Inhibitors	81
5.6.1.1	Die simultane Inhibition des PI3K/Akt- und BZR-Signalwegs reduziert die Viabilität der CLL-Zelllinie HG3	81
5.6.1.2	Die simultane Inhibition des PI3K/Akt- und BZR-Signalwegs reduziert die Proliferation der CLL-Zelllinie HG3	82
5.6.1.3	Die simultane Inhibition des PI3K/Akt- und BZR-Signalwegs zeigt keinen Einfluss auf die CAT-1-Proteinexpression der CLL-Zelllinie HG3	83
5.6.1.4	Die simultane Inhibition des PI3K/Akt- und BZR-Signalwegs zeigt keinen Einfluss auf die CAT-1-mRNA-Expression der CLL-Zelllinie HG3	85
5.6.2	Analyse der CAT-1-Expression der CLL-Zelllinie HG3 bei Kombination des Akt- und NF- κ B-Inhibitors	86
5.6.2.1	Die simultane Inhibition des PI3K/Akt- und NF- κ B-Signalwegs reduziert die Viabilität der CLL-Zelllinie HG3	86
5.6.2.2	Die simultane Inhibition des PI3K/Akt- und NF- κ B-Signalwegs reduziert die Proliferation der CLL-Zelllinie HG3	87
5.6.2.3	Die simultane Inhibition des PI3K/Akt- und NF- κ B-Signalwegs zeigt keinen Einfluss auf die CAT-1-Proteinexpression der CLL-Zelllinie HG3	88
5.6.2.4	Die simultane Inhibition des PI3K/Akt- und NF- κ B-Signalwegs zeigt keinen Einfluss auf die CAT-1-mRNA-Expression der CLL-Zelllinie HG3	90
5.6.3	Analyse der CAT-1-Expression der CLL-Zelllinie HG3 bei Kombination des BTK- und NF- κ B-Inhibitors	91
5.6.3.1	Die simultane Inhibition des BZR- und NF- κ B-Signalwegs reduziert die Viabilität der CLL-Zelllinie HG3	91
5.6.3.2	Die simultane Inhibition des BZR- und NF- κ B-Signalwegs reduziert die Proliferation der CLL-Zelllinie HG3	92
5.6.3.3	Die simultane Inhibition des BZR- und NF- κ B-Signalwegs zeigt keinen Einfluss auf die CAT-1-Proteinexpression der CLL-Zelllinie HG3	93
5.6.3.4	Die simultane Inhibition des BZR- und NF- κ B-Signalwegs zeigt keinen Einfluss auf die CAT-1-mRNA-Expression der CLL-Zelllinie HG3	95
5.7	Analyse der CAT-1-Expression primärer CLL-Zellen bei Inkubation mit dem Akt-, BTK- und NF-κB-Inhibitor	96
5.7.1	Die Immunphänotypisierung der einzelnen Patientenproben zeigt jeweils eine überwiegend CD5 ⁺ -B-Zellpopulation der durch Ficoll-Gradientenzentrifugation isolierten, primären CLL-Zellen	98
5.7.2	Die Inhibition des PI3K/Akt-, BZR- und NF- κ B-Signalwegs reduziert die Viabilität, Proliferation und CAT-1-Proteinexpression der primären CLL-Zellen	101
5.8	Vereinfachte Darstellung der Effekte der Inhibitoren	105

6	Diskussion	106
6.1	Aktueller Stand in der Therapie der CLL	106
6.2	Einordnung in die Literaturdiskussion	107
6.3	Bedeutung der Ergebnisse	115
6.4	Ausblick	115
7	Zusammenfassung	117
8	Literaturverzeichnis	119
9	Danksagung	131
10	Curriculum vitae	132

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Durchschnittliche jährliche Zahl an Neuerkrankungen und altersspezifischen Inzidenzraten der CLL in Deutschland (2012-2014).	2
Abbildung 2: Erstlinientherapie der CLL.	6
Abbildung 3: Umwandlung von Citrullin in Arginin durch die Enzyme ASS und ASL. .	8
Abbildung 4: ASS-Expression in Immun- und Tumorzellen.	12
Abbildung 5: Schema des PI3K/Akt-Signalwegs.	20
Abbildung 6: Schema des NF- κ B-Signalwegs.	26
Abbildung 7: Schema des B-Zell-Rezeptor-Signalwegs.	31
Abbildung 8: Analyse der Phosphorylierung relevanter Signaltransduktionsproteine (pAkt (Ser473), pAkt (Thr308), pPLC γ 2, pI κ B α) in CLL- (HG3, JVM-2, MEC1) und MM-Zelllinien (FD50, NCI-A2).	57
Abbildung 9: Die Viabilität der CLL-Zelllinie HG3 wird bei Argininmangel gehemmt.	59
Abbildung 10: Die CAT-1-Proteinexpression der CLL-Zelllinie HG3 wird bei Argininmangel induziert.	60
Abbildung 11: Die Viabilität der CLL-Zelllinie HG3 wird durch den Akt-Inhibitor gehemmt.	62
Abbildung 12: Die Proliferation der CLL-Zelllinie HG3 wird durch den Akt-Inhibitor gehemmt.	63
Abbildung 13: Die CAT-1-Proteinexpression der CLL-Zelllinie HG3 wird durch den Akt-Inhibitor gehemmt.	65
Abbildung 14: Der Akt-Inhibitor zeigt keinen Einfluss auf die CAT-1-mRNA-Expression der CLL-Zelllinie HG3.	66
Abbildung 15: Der BTK-Inhibitor zeigt keinen Einfluss auf die Viabilität der CLL-Zelllinie HG3.	68
Abbildung 16: Die Proliferation der CLL-Zelllinie HG3 wird durch den BTK-Inhibitor gehemmt.	69
Abbildung 17: Die Stoffwechselaktivität der CLL-Zelllinie HG3 wird durch den BTK-Inhibitor gehemmt.	70
Abbildung 18: Die CAT-1-Proteinexpression der CLL-Zelllinie HG3 wird durch den BTK-Inhibitor gehemmt.	72
Abbildung 19: Der BTK-Inhibitor zeigt keinen Einfluss auf die CAT-1-mRNA-Expression der CLL-Zelllinie HG3.	73

Abbildung 20: Die Viabilität der CLL-Zelllinie HG3 wird durch den NF- κ B-Inhibitor gehemmt.	75
Abbildung 21: Die Proliferation der CLL-Zelllinie HG3 wird durch den NF- κ B-Inhibitor gehemmt.	76
Abbildung 22: Die Stoffwechselaktivität der CLL-Zelllinie HG3 wird durch den NF- κ B-Inhibitor gehemmt.....	77
Abbildung 23: Der NF- κ B-Inhibitor zeigt keinen Einfluss auf die CAT-1-Proteinexpression der CLL-Zelllinie HG3.....	78
Abbildung 24: Der NF- κ B-Inhibitor zeigt keinen Einfluss auf die CAT-1-mRNA-Expression der CLL-Zelllinie HG3.....	79
Abbildung 25: Die Viabilität der CLL-Zelllinie HG3 wird durch die Kombination von Akt- und BTK-Inhibitor gehemmt.	82
Abbildung 26: Die Proliferation der CLL-Zelllinie HG3 wird durch die Kombination von Akt- und BTK-Inhibitor gehemmt.....	83
Abbildung 27: Die Kombination des Akt- und BTK-Inhibitors zeigt keinen Einfluss auf die CAT-1-Proteinexpression der CLL-Zelllinie HG3.....	84
Abbildung 28: Die Kombination des Akt- und BTK-Inhibitors zeigt keinen Einfluss auf die CAT-1-mRNA-Expression der CLL-Zelllinie HG3.....	85
Abbildung 29: Die Viabilität der CLL-Zelllinie HG3 wird durch die Kombination von Akt- und NF- κ B-Inhibitor gehemmt.....	87
Abbildung 30: Die Proliferation der CLL-Zelllinie HG3 wird durch die Kombination von Akt- und NF- κ B-Inhibitor gehemmt.....	88
Abbildung 31: Die Kombination des Akt- und NF- κ B-Inhibitors zeigt keinen Einfluss auf die CAT-1-Proteinexpression der CLL-Zelllinie HG3.....	89
Abbildung 32: Die Kombination des Akt- und NF- κ B-Inhibitors zeigt keinen Einfluss auf die CAT-1-mRNA-Expression der CLL-Zelllinie HG3.....	90
Abbildung 33: Die Viabilität der CLL-Zelllinie HG3 wird durch die Kombination von BTK- und NF- κ B-Inhibitor gehemmt.....	92
Abbildung 34: Die Proliferation der CLL-Zelllinie HG3 wird durch die Kombination von BTK- und NF- κ B-Inhibitor gehemmt.....	93
Abbildung 35: Die Kombination von BTK- und NF- κ B-Inhibitor zeigt keinen Einfluss auf die CAT-1-Proteinexpression der CLL-Zelllinie HG3.....	94
Abbildung 36: Die Kombination des BTK- und NF- κ B-Inhibitors zeigt keinen Einfluss auf die CAT-1-mRNA-Expression der CLL-Zelllinie HG3.....	95

Abbildung 37: Die Immunphänotypisierung der primären CLL-Zellen zeigt eine CD5 ⁺ -B-Zell-Population.....	98
Abbildung 38: Die Immunphänotypisierung der primären CLL-Zellen zeigt eine überwiegend CD5 ⁺ -B-Zell-Population.	99
Abbildung 39: Die Immunphänotypisierung der primären CLL-Zellen zeigt eine überwiegend CD5 ⁺ -B-Zell-Population.	100
Abbildung 40: Die Viabilität, Proliferation und CAT-1-Proteinexpression der primären CLL-Zellen werden durch den Akt-, BTK- und NF- κ B-Inhibitor gehemmt.	104

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stadieneinteilung nach Binet	3
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien	34
Tabelle 3: Verwendete Medien und Medienzusätze	35
Tabelle 4: Verwendete Lösungen und Puffer	35
Tabelle 5: Verwendete Kits	37
Tabelle 6: Verwendete Geräte	38
Tabelle 7: Verwendete Zelllinien	39
Tabelle 8: Verwendete Inhibitoren	39
Tabelle 9: Verwendete Primärantikörper	40
Tabelle 10: Verwendete Sekundärantikörper	40
Tabelle 11: Weitere Materialien für den Western Blot	41
Tabelle 12: Zusammensetzung der genutzten Zellkulturmedien	42
Tabelle 13: Zusammensetzung des Argininmangelmediums	44
Tabelle 14: Zusammensetzung eines 12%igen Polyacrylamidgels	49
Tabelle 15: Ansetzen der Primärantikörper	50
Tabelle 16: Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese	52
Tabelle 17: PCR-Programm zur cDNA-Synthese	53
Tabelle 18: Reaktionsansatz für die qRT-PCR	53
Tabelle 19: PCR-Programm der qRT-PCR	54
Tabelle 20: Übersicht über die verwendeten DMSO-Kontrollen	97
Tabelle 21: Anteil CD3 ⁺ -, CD5 ⁺ - und CD19 ⁺ -Zellen in den Patientenproben	100
Tabelle 22: Vereinfachte Darstellung der Effekte der Inhibitoren	105

Abkürzungsverzeichnis

A	ACC	Acceleration	D	DAG	Diacylglycerin
	ADP	Adenosindiphosphat		DEC	Deceleration
	AK	Antikörper		Del	Deletion
	Akt	Ak strain transforming		DMSO	Dimethylsulfoxid
	ALL	Akute Lymphatische Leukämie		DNA	Desoxyribonukleinsäure
	AMPK	Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase		dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphat
	APS	Ammoniumpersulfat	E	ECL	Enhanced chemiluminescence
	Arg	Arginin		EDTA	Ethylendiamintetraacetat
	AS-160	Aminosäure-160		EGF	Epidermal growth factor
	Asc-1/2	Asc-type amino acid transporter 1/2		eIF2α	Eukaryotic initiation factor 2 α
	ASL	Argininosuccinatyase		ELAM1	Endothelial-leukocyte adhesion molecule 1
	ASS-1	Argininosuccinatsynthetase		ERK1/2	Extracellular-signal regulated kinases 1/2
	AT	Amino acid transporter		EtOH	Ethanol
	ATP	Adenosintriphosphat	F	FACS	Fluorescence activated cell sorting
B	B2M	Beta-2-Mikroglobulin		FAM	6-Carboxyfluorescein
	BAD	Bcl-2-antagonist of cell death		FCR	Fludarabin + Cyclophosphamid + Rituximab
	BCAP	B-cell receptor-associated protein tyrosine kinases		FCS	Fetal calf serum (Fetales Kälberserum)
	Bcl	B-cell lymphoma		FITC	Fluoresceinisothiocyanat
	Bcl-2	B-cell lymphoma 2		FoxO	Forkhead-box-protein O
	Bcl-xL	B-cell lymphoma xL		FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
	bFGF	b fibroblast growth factor		FSC	Forward Scatter (Vorwärtsstreulich)
	BIRC3	Baculoviral IAP repeat-containing protein 3	G	GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat- Dehydrogenase
	Bik	B lymphocyte kinase		GCN2	General control nonderepressible 2
	BLNK	B-cell linker protein		GSK3	Glykogensynthase-Kinase 3
	BNIP3	BCL2/adenovirus E1B protein- interacting protein 3		GTP	Guanosintriphosphat
	BSA	Bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)	H	HAT	Heteromere Aminosäure-Transporter
	BTK	Bruton's tyrosine kinase		hCAT	Humaner kationischer Aminosäure- Transporter
	BZR	B-Zell-Rezeptor	I	ICAM-1	Intracellular adhesion molecule 1
C	Ca	Calcium		Ig	Immunglobulin
	CA	Karzinom		IGF-1	Insulin-like growth factor 1
	CaM	Calmodulin		IGHV	Ig heavy chain variable region
	CAT	Kationischer Aminosäure- Transporter		IκB	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor
	CD	Cluster of differentiation		IKK	I κ B kinase
	CDK	Cyclin-dependent kinase		IL	Interleukin
	cDNA	Komplementäre DNA		IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
	cFLIP	FLICE-like inhibitory protein		IFN	Interferon
	CIRS	Cumulative illness rating scale		IP₂	Inositoldiphosphat
	CLL	Chronische Lymphatische Leukämie		IP₃	Inositoltriphosphat
	COX-2	Cyclooxygenase 2		IRES	Internal ribosome entry site
	CO₂	Kohlenstoffdioxid		ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
	c-Raf	Rapidly accelerated fibrosarcoma		ITIM	Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif

J	JNK1/2	c-Jun N-terminal kinases 1/2	PIP₂	Phosphoinositoldisphosphat
K	k.o.	knockout	PIP₃	Phosphoinositoltriphosphat
L	LAT	L-amino acid transporter	PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
	LFA2	Lymphocyte function-associated antigen 2	PKB	Proteinkinase B
	LK	Lymphknoten	PKC	Proteinkinase C
	LT-β	Lymphotoxin-beta	PLC	Phospholipase C
M	MAP1LC3B	Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B	PP2A	Protein-Phosphatase 2A
	MCL-1	Induced myeloid leukemia cell differentiation protein Mcl-1	PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis
	Mdm2	Mouse double minute 2 homolog	PTEN	Phosphatase and tensin homolog
	MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase	PTK	Proteintyrosinkinase
	MHC	Major histocompatibility complex	p21	Protein 21
	miRNA	microRNA	p27	Protein 27
	MM	Multiples Myelom	p38-MAPK	Protein 38 mitogen-activated protein kinases
	mRNA	Messenger RNA	p53	Protein 53
	mTORC	Mammalian target of rapamycin complex	p70S6K	Ribosomal protein S6 kinase beta 1
	MYD88	Myeloid differentiation primary response 88	Q	qRT-PCR Quantitative real-time PCR
N	Na	Natrium	R	RANKL Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
	Nck	Non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1		rBAT Neutral and basic amino acid transport protein
	NEMO	NF-Kappa-B essential modulator		RelA/B Transcription factor RelA/B
	NES	Nuclear export signal		RHD Rel homology domain
	NFAT	Nuclear factor of activated T-cells		Rheb Ras homolog enriched in brain
	NF-κB	Nuclear factor κB		RIPA Radioimmunoprecipitation assay buffer
	NFKBIE	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor episolon		RNA Ribonukleinsäure
	NIK	NF-kappa-B-inducing kinase		RPMI Roswell Park Memorial Institute
	NK	Natürliche Killerzellen		RTK Rezeptortyrosinkinase
	NLS	Nuclear localization signal		SDS Sodiumdodecylsulfat
	NO	Stickstoffmonoxid	S	Ser Serin
	NTAL	Non-T-cell-activation linker		SKp-Cullin-F-box-Typ 3 S-phase kinase-associated protein-Cullin-F-box Typ 3
O	O₂	Sauerstoff		SLC Solute carrier
P	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese		SSC Sideward Scatter (Seitwärtsstreulicht)
	PAMP	Pathogen associated molecular patterns		TAMRA 5-Carboxytetramethylrhodamin
	PBMC	Peripheral blood mononuclear cell	T	TBS Tris-buffered saline
	PBS	Phosphate Buffered Saline		TCL1 T-cell leukemia/lymphoma protein 1
	PCR	Polymerase-Kettenreaktion		TGFβ Transforming growth factor beta
	PDGF	Platelet-derived growth factor		Thr Threonin
	PDK	Phosphoinositide-dependent kinase-1		TLR Toll-like-Rezeptor
	PE	Phycoerythrin		TNF Tumornekrosefaktor
	PFKFB2	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 2		TP53 Tumor protein p53
	PH	Pleckstrin-homolog		TRAF1/2 TNF receptor-associated factor 1
	PHLPP1/2	PH domain and leucine rich repeat protein phosphatases 1/2		TSC1/2 Tuberous sclerosis 1/2
	PI	Propidiumiodid		

U	UV	ultraviolett
V	VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1
	VEGF	Vascular endothelial growth factor
W	WB	Western Blot
	WHO	Weltgesundheitsorganisation
X	xCT	Cystine/glutamate transporter
Z	ZAP70	Zeta-chain-associated protein kinase 70
#	4E-BP1	Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1
	4F2hc	4F2 cell-surface antigen heavy chain

m	Meter	kDa	Kilodalton	Mio	Millionen
cm	Zentimeter	M	Molar	A	Ampère
mm	Millimeter	mM	Milimolar	mA	Milliampère
µm	Mikrometer	µM	Mikromolar	V	Volt
nm	Nanometer	kg	Kilogramm	U	Spannung
l	Liter	g	Gramm	h	Stunden
ml	Milliliter	mg	Milligramm	min	Minuten
µl	Mikroliter	µg	Mikrogramm	s	Sekunden
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)	%	Prozent	ms	Millisekunden
°C	Grad Celsius				

1 Einleitung

Die Chronische Lymphatische Leukämie (CLL) ist die häufigste Leukämie-Erkrankung in den westlichen Ländern. In den letzten Jahren kam es zur Etablierung neuer Medikamente in der CLL-Therapie, die vor allem auf intrazelluläre Signalwege zielen. Dabei stellen der B-Zell-Rezeptor-Signalweg (Ibrutinib, Acalabrutinib, Idelalisib) und die Bcl2-vermittelte Apoptose (Venetoclax) zwei neue Zielstrukturen dar. Trotz der Entwicklung und Etablierung dieser neuen Substanzen in der Erst- und Zweitlinientherapie bleibt die CLL weiterhin eine medikamentös nicht heilbare Erkrankung. Aus diesem Grund ist die Entwicklung neuer innovativer Therapie-Ansätze erforderlich. Ein in den letzten Jahren stärker verfolgter Ansatz stellt dabei der Eingriff in den Metabolismus von Tumorzellen dar [1] [2]. Unterschiede im Stoffwechsel von Tumorzellen und physiologischen Zellen versucht man auszunutzen, um neue zielgerichtete Therapie-Ansätze zu entwickeln. Erste vielversprechende Ansätze stellen dabei die klinisch bereits etablierte Asparagin-Depletion durch eine Asparaginase bei Akuter Lymphatischer Leukämie (ALL) [3] und die noch im präklinischen Stadium sich befindende Cystein-Depletion durch eine Cysteinase bei der CLL dar [4].

Das Wachstum und die Viabilität von Tumorzellen sind in erheblichem Maße von dem Vorhandensein von Aminosäuren abhängig [5] [6]. Dabei stellt unter anderem die Aminosäure Arginin einen wichtigen Metaboliten dar. Einige Tumorentitäten (unter anderem CLL, ALL, akute myeloische Leukämie (AML) sowie weitere solide Tumore [7] [8] [9]) können Arginin nicht intrazellulär aus Citrullin synthetisieren, da sie das Enzym Argininosuccinat-Synthetase (ASS) nicht exprimieren. Aus diesem Grund sind CLL-Zellen auf die Aufnahme von extrazellulärem Arginin angewiesen. Eine Depletion von extrazellulärem Arginin führt dabei zu einer Hemmung der Proliferation und Viabilität der CLL-Zellen [10]. Neben der enzymatischen Restriktion des extrazellulären Arginins [11] [12] [13] stellt dabei die Hemmung der für die Arginin-Aufnahme benötigten Transporter einen neuen Ansatz in der Therapie dar. Der kationische Aminosäure-Transporter (CAT-1) ist dabei unter physiologischen Bedingungen der einzige Arginin-Importer bei CLL-Zellen [10]. Ein Ansatz zur Hemmung der Arginin-Aufnahme über den CAT-1 ist daher die Identifizierung von Signalwegen in CLL-Zellen, die für die Expression des Transporters verantwortlich sind. Die Identifizierung dieser Signalwege sowie die Auswirkungen auf die Proliferation und Viabilität der CLL-Zellen stellen den Gegenstand meiner Arbeit dar.

2 Literaturdiskussion

2.1 Chronische Lymphatische Leukämie (CLL)

Die Chronische Lymphatische Leukämie (CLL) ist die häufigste Leukämie-Erkrankung in den westlichen Industrieländern. Bei ungefähr 40 % aller Leukämien und 1 % aller Krebserkrankungen handelt es sich um eine CLL. Das mediane Erkrankungsalter liegt zwischen dem 70. und 75. Lebensjahr und zeigt eine große Altersspannbreite. Bei Männern liegen das mediane Erkrankungsalter bei 72 Jahren und das mediane Sterbealter bei 78 Jahren. Bei Frauen wiederum liegen das mediane Erkrankungsalter bei 75 Jahren und das mediane Sterbealter bei 83 Jahren [14].

Die Krankheit tritt gehäuft bei Männern auf [15]. Von 100.000 Männern erkranken im Laufe ihres Lebens durchschnittlich circa 7,4 an einer CLL, wohingegen nur durchschnittlich 4,8 Erkrankungen bei 100.000 Frauen auftreten. Jährlich treten ungefähr 5000 bis 6000 Neuerkrankungen auf (circa 60 % davon bei Männern und 40 % bei Frauen). Dabei zeigten sich in den letzten zehn Jahren circa gleichbleibende Häufigkeiten bei Inzidenz und Prävalenz mit geringen Schwankungen [14]. Bei Patienten aus dem afrikanischen oder dem asiatischen bzw. pazifischen Raum zeigt sich aufgrund eines genetischen Hintergrunds ein geringeres Erkrankungsrisiko [16].

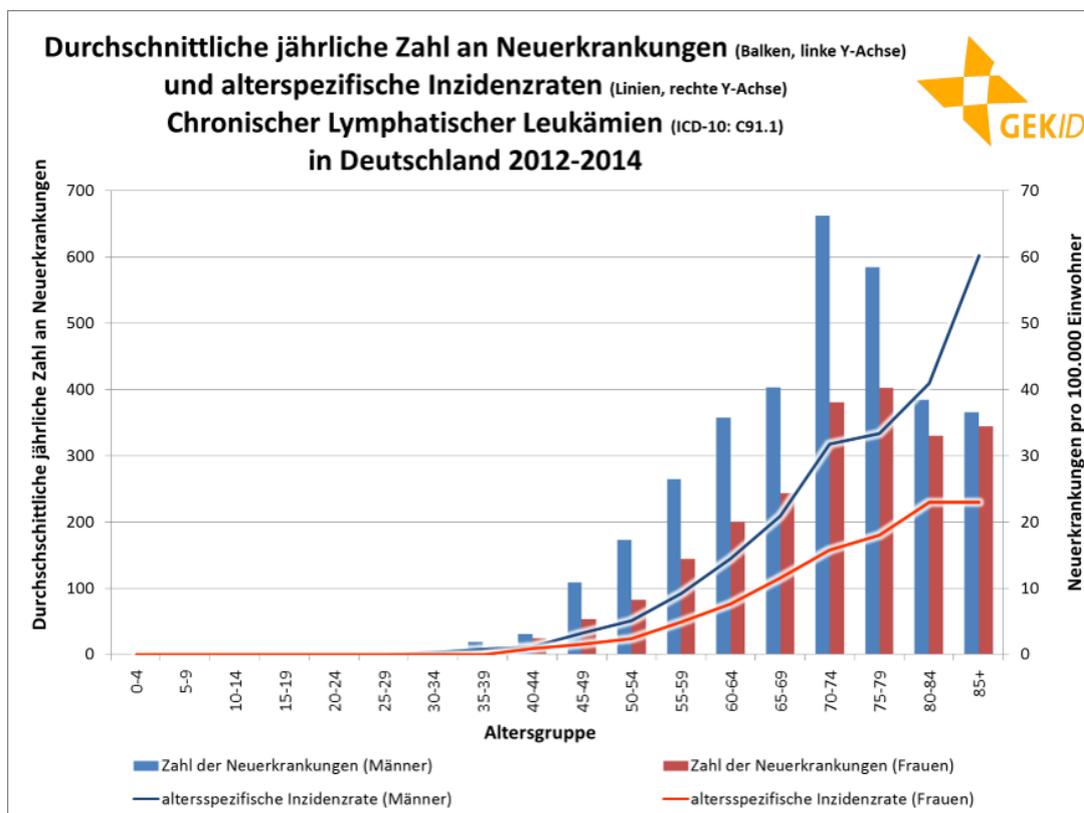


Abbildung 1: Durchschnittliche jährliche Zahl an Neuerkrankungen und altersspezifischen Inzidenzraten der CLL in Deutschland (2012-2014).

Erläuterungen im Text (modifiziert nach Onkopedia, September 2020 [14])

Aufgrund des Anstiegs der Inzidenz mit zunehmendem Lebensalter ist mit einem Anstieg der CLL-Prävalenz durch den demographischen Wandel in den nächsten Jahrzehnten zu rechnen.

Die CLL zählt zu den niedrig-malignen Non-Hodgkin-Lymphomen. Dabei handelt es sich um eine heterogene Gruppe aus B- und T-Zell-Neoplasien, die nach der WHO-Klassifikation eingeteilt werden. Die CLL zählt dabei zu den indolenten, lymphozytenreichen Lymphomen mit einer lymphozytären Leukozytose im Blutbild. Dabei entarten bei der CLL antigenexponierte, reife CD5⁺ B-Lymphozyten, die sich im Blut, im Knochenmark, den Lymphknoten und der Milz anreichern [17]. Sie lässt sich dadurch von der ähnlich verlaufenden, sehr seltenen T-Prolymphozyten-Leukämie (früher: T-CLL) abgrenzen.

Die CLL verläuft im Vergleich zu den restlichen Leukämien klinisch sehr variabel, wobei sich ein deutlich langsames Wachstum als bei anderen Leukämien zeigt. Häufig findet sich bei Patienten eine sogenannte monoklonale B-Lymphozytose, die ein prämaligues Vorläuferstadium darstellt und bei circa 5 % der über 60-Jährigen auftritt. Das Risiko einer Transformation in eine CLL steigt dabei ab dem 60. Lebensjahr um ungefähr 1 % pro Jahr [18].

Die klinische Stadieneinteilung der CLL erfolgt unter anderem gemäß der Klassifikation nach Binet [19]. Dabei werden der Hämoglobin-Wert, die Thrombozyten-Zahl und eine körperliche Untersuchung (mit Beurteilung der Anzahl der betroffenen Regionen) berücksichtigt. Die Binet-Klassifikation erlaubt eine Aussage über das mediane Überleben von Patienten, die an einer CLL erkranken.

Tabelle 1: Stadieneinteilung nach Binet

Stadium	Definition	Medianes Überleben*
A	Hämoglobin > 10 g/dl Thrombozyten > 100.000/ μ l < 3 betroffene Regionen (LKs, Leber oder Milz)	> 10 Jahre
B	Hämoglobin > 10 g/dl Thrombozyten > 100.000/ μ l > 3 betroffene Regionen (LKs, Leber oder Milz)	5 Jahre
C	Hämoglobin < 10 g/dl Thrombozyten < 100.000/ μ l	2-3 Jahre

* Medianes Überleben vor Einführung von Chemoimmuntherapien und gezielten Arzneimitteln im Stadium B/C

Zusätzlich lassen sich bei zahlreichen Patienten charakteristische, genetische Aberrationen feststellen, die eine Einteilung in klinisch relevante Subgruppen erlauben. Die häufigste genetische Aberration stellt dabei eine Deletion auf dem langen Arm von Chromosom 13 dar (del(13q14)) [20]. Je nach genetischer Aberration sind unterschiedliche Signalübertragungswege in den B-Lymphozyten aktiviert [21]. Eine besondere Rolle in der Entwicklung einer CLL spielen dabei der B-Zell-Rezeptor-Signalweg sowie BCL-2-abhängige Signalwege, welche die Apoptose der Zellen hemmen [21].

Die Symptome bei Patienten mit einer CLL sind von Patient zu Patient unterschiedlich. Häufig klagen die Patienten über Leistungsschwäche, B-Symptomatik (ungewollte Gewichtsabnahme > 10 % in den letzten 6 Monaten, Fieber, Nachtschweiß) sowie eine verstärkte Neigung zu Infektionen. Zudem können sich in der körperlichen Untersuchung eine lokale oder generalisierte Lymphadenopathie oder eine Organomegalie (Hepatomegalie bzw. Splenomegalie) sowie Blutungs- und Anämie-Zeichen zeigen. Durch das verstärkte Wachstum monoklonaler B-Lymphozyten kommt es im Knochenmark zu einer Verdrängung der restlichen Blutzell-Linien. Daher können sich im Blutbild eine Thrombozytopenie und eine Anämie zeigen.

Die Diagnose einer CLL erfolgt nach den IWCLL-Kriterien (*international workshop on chronic lymphocytic leukemia*) [22]. Voraussetzungen für die Diagnose einer CLL sind dabei:

- 1) Nachweis von mind. 5000 klonalen B-Lymphozyten pro μ l Blut (Dauer > 3 Monate)
- 2) Nachweis kleiner, reif wirkender Lymphozyten im Blutaussstrich
- 3) charakteristische Immunphänotypisierung (Koexpression der B-Zell-Antigene CD19, CD20, CD23 + T-Zell-Antigen CD5, ggf. auch CD20 oder CD79b)

Zudem kann eine Monoklonalität der Zellen durch eine Leichtketten-Restriktion (Ig-Lambda bzw. Ig-Kappa) nachgewiesen werden.

Zur Beurteilung von unklaren Zytopenien kann eine Knochenmarkspunktion sinnvoll sein. Zudem ist eine Lymphknoten-Biopsie bei fehlender leukämischer Ausschwemmung oder bei Verdacht auf eine Transformation in ein aggressives Lymphom (Richter-Syndrom) indiziert. Für die weitere Therapie-Planung ist außerdem eine genetische Untersuchung mit dem Nachweis der Deletion del(17p13) bzw. einer TP53-Mutationsanalyse sowie die Feststellung des IGHV-Mutationsstatus (variable Region der Immunglobulin-Schwerkette) wichtig.

In den letzten Jahren wurden in der Therapie der Chronischen Lymphatischen Leukämie zahlreiche neue Medikamente etabliert. Trotzdem stellt die CLL weiterhin eine pharmakologisch nicht heilbare Erkrankung dar. Lediglich eine allogene Stammzelltransplantation mit einem passenden Spender kann zu einer Heilung der CLL führen.

Eine Therapie der CLL sollte erst bei Vorliegen von Symptomen erfolgen [23]. Zur Beurteilung einer Therapieindikation wird die Klassifikation nach Binet herangezogen. Dabei sollte im Stadium Binet C immer eine Therapie durchgeführt werden. Gegebenenfalls kann auch bereits im Stadium Binet A und B eine Therapie erfolgen, wenn zusätzlich weitere Kriterien erfüllt werden (z.B. massive Splenomegalie, massive Lymphadenopathie, B-Symptomatik, Lymphozytenverdopplungszeit < 6 Monate, Autoimmunzytopenie trotz Standard-Steroidtherapie).

Die Wahl der Therapie ist dabei abhängig vom Allgemeinzustand und den Komorbiditäten des Patienten [23]. Die Klassifizierung der Komorbiditäten eines Patienten erfolgt nach dem CIRS-Score (cumulative illness rating scale). Die optimale Kombination der verwendeten Pharmaka ist dabei noch nicht vollständig etabliert und Gegenstand zahlreicher Studien.

Die Wahl der Erstlinien-Therapie ist abhängig vom genetischen Befund. Patienten mit einer del(17p13)- oder TP53-Mutation bzw. mit unmutiertem IGHV-Status sprechen in der Regel schlechter auf eine pharmakologische Therapie an und zeigen ein kürzeres, progressionsfreies Überleben sowie ein kürzeres Gesamtüberleben. Patienten ohne eine der oben genannten, genetischen Mutationen bzw. mit mutiertem IGHV-Status und einem gutem Allgemeinzustand (keine relevanten Komorbiditäten, normale Nierenfunktion, CIRS > 6) sollten eine Chemoimmuntherapie nach dem FCR-Schema (Fludarabin, Cyclophosphamid, Rituximab), eine Therapie mit einem BTK-Inhibitor (Ibrutinib oder Acalabrutinib) oder eine Obinutuzumab-Venetoclax-Kombinationstherapie erhalten [14]. Bei schlechterem Allgemeinzustand der Patienten bzw. höherem Lebensalter stehen ebenfalls verschiedene Therapie-Optionen zur Verfügung: Obinutuzumab + Venetoclax, Ibrutinib ± anti-CD20-Antikörper, Chlorambucil + Obinutuzumab oder Bendamustin + Rituximab [14]. Bei Patienten mit sehr schlechtem Allgemeinzustand sollte die Therapie symptomatisch („best supportive care“) erfolgen.

Patienten mit oben genannter del(17p13)- oder TP53-Mutation bzw. mit unmutiertem IGHV-Status sollten eine Therapie mit Ibrutinib ± anti-CD20-Antikörper oder Venetoclax + Obinutuzumab erhalten [14]. In der Zweitlinientherapie sind die

therapeutischen Möglichkeiten je nach Vorbehandlung und Allgemeinzustand des Patienten noch komplexer. Zusätzlich sollte bei diesen Hochrisiko-Patienten ab dem ersten Rezidiv auch eine allogene Stammzelltransplantation je nach individuellen Risiken (Alter, Komorbiditäten, Verfügbarkeit eines passenden Spenders) erwogen werden [24].

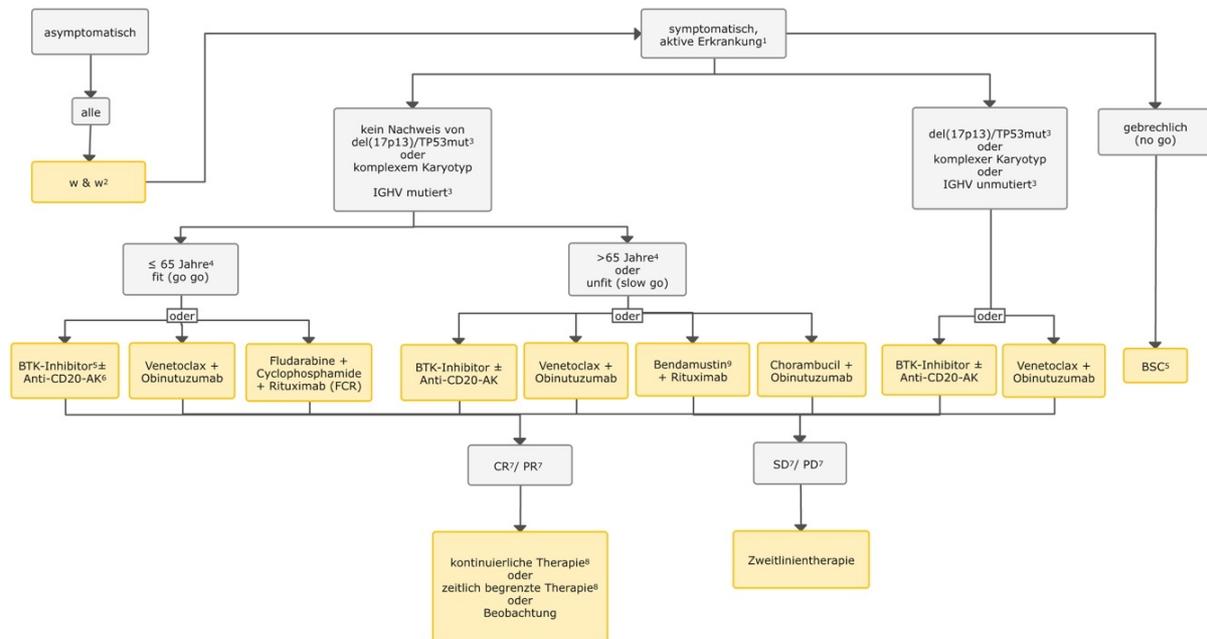


Abbildung 2: Erstlinientherapie der CLL.

Erläuterungen im Text (modifiziert nach [14]). ¹ aktive Erkrankung nach Kriterien des IWCLL (2018), ² w & w – abwartendes Verhalten, ⁴ Altersgrenzen basieren auf den Einschlusskriterien der zugrundeliegenden Studien; die Therapiewahl soll sich an der Komorbidität und weniger am kalendarischen Alter orientieren; ⁵ Therapie: BR – Bendamustin/Rituximab, BSC – Best Supportive Care, BTK-Inhibitor ± Anti-CD20-AK – Bruton-Tyrosinkinase-Inhibitor (Acalabrutinib, Ibrutinib), mit oder ohne Obinutuzumab/Rituximab; Clb+Obi – Chlorambucil mit Obinutuzumab, FCR – Fludarabin mit Cyclophosphamid und Rituximab, Ven + Obi – Venetoclax mit Obinutuzumab; ⁶ Anti-CD20-AK: die Zulassungsstudien wurden mit BTKI als Monotherapie (Ibrutinib) oder in Kombination mit den Anti-CD20-Antikörpern Obinutuzumab bzw. Rituximab durchgeführt; ⁷ CR – komplette Remission, PD – Progress, PR – partielle Remission, SD – stabile Erkrankung: nach den Kriterien des IWCLL 2018 wird eine stabile Erkrankung als Therapieversagen gewertet; die Anwendung dieser formalen Einteilung und die damit verbundene Entscheidung zum Therapiewechsel ist individuell zu treffen; ⁸ kontinuierliche Therapie bis zum Progress bei Ibrutinib, zeitlich begrenzte Therapie über 12 Monate bei Venetoclax, Beobachtung nach Chemotherapie; ⁹ Dosisreduktion von Bendamustin auf 70 mg/m² (Tag 1/2) bei Patienten in reduziertem Allgemeinzustand (slow go)

Trotz der Entwicklung zahlreicher neuer Substanzen in der Therapie der Chronischen Lymphatischen Leukämie in den letzten Jahren bleibt die CLL weiterhin eine medikamentös nicht heilbare Erkrankung. Daher bedarf es der Entwicklung und Etablierung neuer innovativer Therapie-Ansätze.

2.2 Arginin und Immunsystem

Das menschliche Immunsystem dient der Abwehr pathogener Erreger (wie Bakterien und Viren) oder Fremdkörper und verhindert dadurch die Gewebeschädigung durch Mikroorganismen. Für eine effiziente und adäquate Immunantwort ist ein Netzwerk aus mehreren Zellen und humoralen Faktoren in unterschiedlichen Organen des Körpers verantwortlich.

Grundsätzlich unterscheidet man ein angeborenes (unspezifisches) und ein erworbenes (spezifisches) Immunsystem. Das angeborene Immunsystem umfasst eine Vielzahl von bereits seit der Geburt bestehenden Abwehrmechanismen gegen in den Körper eindringende Pathogene. Diese Abwehrmechanismen führen in der Regel zu einer schnellen, aber häufig auch ineffektiven Abwehr von Erregern. Neben humoralen Bestandteilen, wie dem Komplementsystem, Akute-Phase-Proteinen oder Proteinen bzw. Enzymen auf der Oberfläche von Schleimhäuten (Lysozym, Lactoferrin, Defensine), zählen Immunzellen, wie Makrophagen, Granulozyten, dendritische Zellen, Mastzellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen), zum angeborenen Immunsystem. Diese tragen auf ihrer Oberfläche Rezeptoren (z.B. Phagozytose-Rezeptoren, Toll-like-Rezeptoren), wodurch sie bestimmte Strukturen (sogenannte „pathogen associated molecular patterns“, PAMPs) pathogener Keime erkennen und folglich eine Immunantwort einleiten können. Viele dieser Zellen (sogenannte antigenpräsentierende Zellen) phagozytieren pathogene Erreger und präsentieren spezifische Antigene des Erregers auf MHC-II-Molekülen an der Oberfläche ihrer Zellen. Dadurch können sie die Zellen des erworbenen (spezifischen) Immunsystems aktivieren, die daraufhin zu einer schnellen und effizienten Bekämpfung eines Erregers beitragen [25].

Das erworbene (spezifische) Immunsystem zeichnet sich durch eine hochspezifische und effektive Abwehr pathogener Erreger aus. Zudem besitzt das erworbene Immunsystem ein sogenanntes immunologisches Gedächtnis. Nach einer erfolgreichen Immunreaktion gegen einen bestimmten Erreger kann bei erneuter Infektion des Erregers eine schnellere und zugleich äußerst effektive Immunantwort eingeleitet werden. Beim erworbenen Immunsystem unterscheidet man zelluläre (T-Lymphozyten, B-Lymphozyten) und humorale Bestandteile (Antikörper bzw. Immunglobuline) [25]. Nach der Präsentation pathogener Antigene über MHC-II-Proteine an der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen kommt es zur Aktivierung von T-Lymphozyten. Dazu binden T-Lymphozyten mit ihren spezifischen T-Zell-Rezeptoren an die über MHC-II präsentierten Antigene der antigenpräsentierenden

Zellen. Zudem kommt es durch die Interaktion weiterer Oberflächenrezeptoren zwischen antigenpräsentierender Zelle und T-Lymphozyt (z.B. LFA2 mit CD2 oder CD80/86 mit CD28) und die autokrine Aktivierung über die Synthese von IL-2 zu einer weiteren Stimulation der T-Lymphozyten. Über CD3- und CD4-Moleküle, die mit dem T-Zell-Rezeptor assoziiert sind, werden intrazellulär Signalwege aktiviert, die zur Proliferation der T-Zelle (Stimulation der Mitose) und Freisetzung von Zytokinen (IL-2, IL-4, uvm.) führen. Durch die freigesetzten Zytokine werden weitere T-Lymphozyten (vor allem CD8⁺-T-Lymphozyten, sogenannte zytotoxische T-Zellen) und B-Lymphozyten aktiviert, welche die Immunantwort gegen das über MHC-II präsentierte Antigen verstärken. Durch eine Aktivierung von B-Lymphozyten entstehen Plasmazellen, die im Rahmen einer Immunantwort spezifische Antikörper (Immunglobuline) gegen das Antigen produzieren und freisetzen [26]. Im Rahmen dieser Immunantwort ist ein fein abgestimmtes Zusammenspiel zwischen proinflammatorischen und antiinflammatorischen immunologischen Systemen erforderlich. Es soll einerseits die schnelle Reaktion des Immunsystems auf das Eindringen eines Pathogens gewährleistet sein, andererseits sollte es nach Abwehr des Erregers zu einer schnellen Suppression der Immunabwehr kommen. Bei Ungleichgewicht in diesem System besteht die Gefahr, dass sich das Immunsystem gegen körpereigene Strukturen wendet und zu einer anhaltenden Entzündung führt (Autoimmunerkrankungen).

Eine besondere Rolle im Rahmen der Immunreaktion kommt auch der Aminosäure Arginin zu. Die kationische Aminosäure Arginin kommt im menschlichen Körper ausschließlich als L-Enantiomer (L-Arginin) vor. Es handelt sich um eine nicht- bzw. semi-essentielle Aminosäure, da sie von den Zellen des menschlichen Körpers aus Citrullin synthetisiert werden kann. Die dafür erforderlichen Enzyme (Argininosuccinat-Synthetase = ASS, Argininosuccinat-Lyase = ASL) werden ubiquitär im Körper exprimiert.

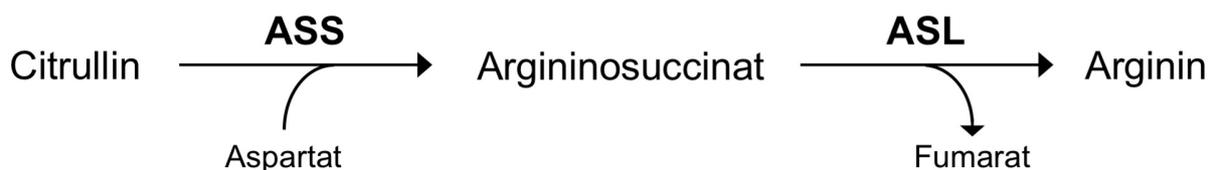


Abbildung 3: Umwandlung von Citrullin in Arginin durch die Enzyme ASS und ASL.
 Erläuterungen im Text (modifiziert nach Werner et al., 2017 [27])

Bei körperlichem Stress, bei Infektionen oder bei Tumorerkrankungen kann es zu einem erhöhten Arginin-Bedarf der (immunologischen) Zellen kommen, wodurch die zelleigene Arginin-Synthese aus Citrullin nicht ausreichend ist [28] [29]. Zudem kommt es im Rahmen einer Fastenperiode, bei Mangelernährung, bei schweren Traumata und Entzündungen oder bei Sepsis zu chronisch erniedrigten Arginin-Spiegeln [30] [31] [32]. In diesem Fall sind die Zellen auf die Zufuhr und Aufnahme von Arginin (oder der Vorstufe Citrullin) aus dem extrazellulären Raum über diverse Aminosäure-Transporter angewiesen. Der energieunabhängige Arginin-Transport erfolgt dabei über verschiedene, auf Aminosäuretransport spezialisierte Zellmembranproteine aus der sogenannten SLC-Familie (solute carrier) [33]. Während das intrazelluläre Arginin über ASS und ASL konsekutiv synthetisiert werden kann, erfolgt die Synthese des extrazellulären Arginins, neben der intestinalen Aufnahme von Arginin aus der Nahrung, über den sogenannten intestinalen-renalen Weg. Dabei kommt es in den intestinalen Enterozyten zu einer Umwandlung der Aminosäuren Prolin, Glutamat oder Glutamin in Citrullin. Dieses wird ins Blut abgegeben und gelangt über den Blutkreislauf in die Nieren. Dort erfolgt die Umwandlung von Citrullin in Arginin über ASS und ASL. Das synthetisierte Arginin wird wiederum in den Blutkreislauf freigesetzt [29].

In den Zellen des menschlichen Körpers kommen der Aminosäure Arginin zahlreiche Funktionen zu. Arginin ist maßgeblich an der Bildung von Harnstoff im Rahmen des Harnstoffzyklus beteiligt. Zudem wird Arginin für die Synthese von Stickstoffmonoxid (NO) benötigt, die vor allem in Zellen des Immunsystems (neutrophile Granulozyten, Makrophagen) und den Endothelien stattfindet [29]. Diese Reaktion wird durch verschiedene Isoformen der NO-Synthase katalysiert, deren Synthese in einigen Zellen des Körpers induzierbar ist (induzierbare NO-Synthase, iNOS). Welche Arginin-metabolisierende Reaktion in einer Immunzelle bevorzugt stattfindet, ist unter anderem abhängig von den freigesetzten Zytokinen im Rahmen einer Infektion. Die durch Arginase I vermittelte Hydrolyse in Ornithin und Harnstoff wird vor allem von T_{H2} -Zytokinen (IL-4, IL-10 und IL-13) vermittelt, während die Synthese von NO durch die iNOS vor allem durch T_{H1} -Zytokine ($IFN\gamma$, $TNF\alpha$, $TNF\beta$) stimuliert wird [34]. Zudem wird Arginin im Rahmen der Proteinbiosynthese, in der Synthese von Polyaminen, von Prolin, Agmatin und Glutamat sowie in der Synthese von Kreatinin und der Nukleotide benötigt [35].

Die Aminosäure Arginin ist maßgeblich an der Entwicklung und Funktion von T- und B- Lymphozyten beteiligt [27] [36] [37]. Durch eine Regulation des T-Zell-Metabolismus wird das Überleben und die tumorsuppressive Wirkung von T-Zellen durch Arginin stimuliert [38] [39]. Hohe Arginin-Spiegel führen zudem zu einer verstärkten Produktion und Freisetzung von Antikörpern durch Plasmazellen [40]. Dabei ist die Synthese einzelner Zytokine ebenfalls abhängig von Arginin (vor allem $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\beta$ und IL-10) [41]. Niedrige Arginin-Spiegel führen hingegen zu einer Hemmung der Differenzierung von Vorläufer-B-Lymphozyten [36]. Zudem konnte gezeigt werden, dass ein Argininmangel zu einer verminderten Proliferation stimulierter T-Lymphozyten führt [34], während erhöhte Arginin-Spiegel eine maximale Proliferation von T-Lymphozyten bezwecken [42]. Bei Argininmangel ist in T-Lymphozyten die Hochregulation des Arginin-Transporters CAT-1 sowie eine vermehrte Expression der ASS zu detektieren [27]. Es findet sich ferner eine über den Transporter LAT1 erfolgende, vermehrte Aufnahme von Citrullin mit konsekutiver, intrazellulärer Metabolisierung in Arginin [27]. Darüber hinaus ist Arginin entscheidend für die Expression von $\text{CD}3\zeta$, welches für die Funktionalität des T-Zell-Rezeptors notwendig ist [43]. In phagozytären Zellen (humane neutrophile Granulozyten und murine, alternativ aktivierte Makrophagen) sind intrazellulär hohe Konzentrationen der Arginase I nachweisbar. Bei Apoptose der phagozytären Zellen kommt es zur Freisetzung der Arginase I mit konsekutivem Abbau des extrazellulären Arginins [34]. Zuletzt kommt der Aminosäure Arginin auch eine entscheidende Rolle in der Suppression der Immunantwort zu. Dabei kommt es durch die Freisetzung der Arginase I aus myeloiden Zellen zu einem Abbau von Arginin, wodurch die weitere Immunantwort von T-Lymphozyten gehemmt wird [34].

Immunzellen brauchen einen dauerhaften, intrazellulären Arginin-Pool, um die NO-Synthese gewährleisten zu können, die für die Abwehr pathogener Erreger wichtig ist. Dazu synthetisieren sie intrazellulär Arginin aus Citrullin über ASS und ASL [27]. Bei dieser Reaktion kommt es im ersten Schritt zur ATP-abhängigen Umwandlung von Citrullin in Argininosuccinat durch die Anlagerung von Aspartat (Enzym: ASS). Diese Reaktion stellt gleichzeitig den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Arginin-Synthese dar. In einer zweiten Reaktion kommt es zur Abspaltung von Fumarat aus Argininosuccinat durch die ASL, wodurch Arginin entsteht.

Tumorzellen zeichnen sich aufgrund ihres starken Wachstums durch einen erhöhten Energie- und Nährstoffbedarf aus. Dafür sind sie unter anderem auf hohe intrazelluläre

Konzentrationen von Aminosäuren angewiesen. Neben ihrer Funktion als Bausteine der Proteine stellen einige Aminosäuren auch wichtige Substrate dar, die zur Energiegewinnung in den Citratzyklus einfließen. Zudem sind Aminosäuren wichtige Regulatoren intrazellulärer Signalwege [44].

Für Tumorzellen semi-essentielle und essentielle Aminosäuren sind dabei Leucin, Isoleucin, Valin, Phenylalanin, Tryptophan, Histidin, Arginin, Lysin, Threonin, Cystein, Asparagin und Glutamin [45]. Die am meisten im menschlichen Körper vorkommende Aminosäure ist Glutamin [44]. Sie ist unter anderem für Tumorzellen essentiell, da sie sowohl über die Bildung von α -Ketoglutarat ein Substrat des Citratzyklus zur Verfügung stellt, als auch eine wichtige Rolle in der Fettsäure-Synthese von Tumorzellen spielt [44]. Die am häufigsten vorkommende Aminosäure in Proteinen von physiologischen Zellen und Tumorzellen ist Leucin. In Tumorzellen ist Leucin maßgeblich an der Regulation und Funktion des mTORC1-Komplexes beteiligt, der wiederum die Proteinbiosynthese von Tumorzellen reguliert [44].

Bei einzelnen Tumorentitäten erfolgt der Import dieser Aminosäuren über spezifische Transportsysteme, die aufgrund des starken Wachstums verstärkt exprimiert werden. So kommen unter anderem dem Transporter ASCT2 (SLC1A5) im Transport von Glutamin, LAT1 (SLC7A5) im Transport von Leucin sowie CAT-1 (SLC7A1) im Transport von Arginin jeweils eine wichtige Rolle zu [44] [45]. Aufgrund der tumorspezifischen Hochregulation einzelner Transportsysteme stellt die Identifizierung und Inhibition dieser Transporter einen neuen Ansatz in der Tumorthherapie dar, der in den letzten Jahren verstärkt verfolgt wurde.

Eine besondere Rolle für die Funktion von Tumor- und Immunzellen spielt neben den Aminosäuren Glutamin und Leucin auch Arginin. Im Tumormikromilieu konkurrieren Tumor- und Immunzellen um die Aufnahme des extrazellulären Arginins [37]. Zudem exprimieren sich im Tumormikromilieu akkumulierende, myeloische Suppressor-Zellen (MDSCs) das Enzym Arginase I, welches zusätzlich zum Abbau des extrazellulären Arginins führt. Durch die niedrigen extrazellulären Arginin-Spiegel wird ein immunsuppressives Milieu geschaffen, welches die weitere Proliferation der T-Lymphozyten hemmt [45]. Dieser Mechanismus führt zur Immunsuppression im Tumormikromilieu („tumore immune escape“) [37].

Gleichzeitig sind zahlreiche Tumorentitäten auf die Aufnahme von extrazellulärem Arginin angewiesen [7] [8] [9] [46], da sie intrazellulär die Argininosuccinat-Synthetase (ASS) nicht exprimieren und damit Arginin nicht aus Citrullin synthetisieren können

(Arginin-Auxotrophie). Dabei kommt es epigenetisch zu einer Methylierung von CpG-Inseln in der Promoter-Region des ASS-Gens, wodurch ASS nicht mehr exprimiert wird [47]. Während erhöhte ASS-Spiegel bei verschiedenen Tumoren mit einem verstärkten Wachstum und einer schlechteren Prognose assoziiert sind [48] [49], wurde für Tumore mit erniedrigten ASS-Spiegeln ein gehäuftes Auftreten von Metastasierung und Medikamenten-Resistenzen nachgewiesen [35] [50]. Tumorzellen unterscheiden sich in ihrem Arginin-Stoffwechsel daher teilweise wesentlich von physiologischen Zellen, weshalb die Arginin-Depletion einen neuen Ansatz in der Tumorthherapie darstellt.

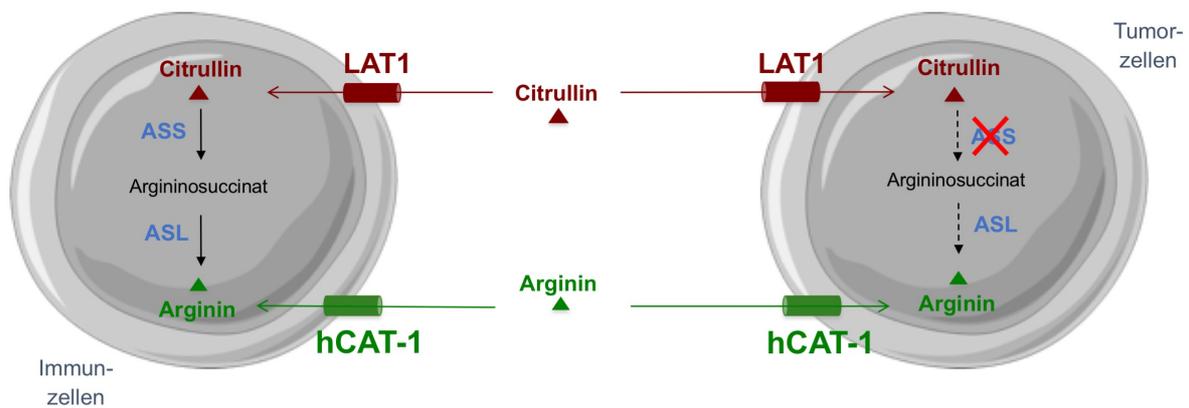


Abbildung 4: ASS-Expression in Immun- und Tumorzellen.
Erläuterungen im Text

Dies zeigt die entscheidende Rolle der Aminosäure Arginin in der Interaktion zwischen Immunsystem und Tumorzellen, auf die ich in meiner weiteren Arbeit näher eingehen möchte. Wie wir in kürzlich veröffentlichten Studien zeigen konnten [10], kommt der Aminosäure Arginin auch eine entscheidende Rolle im Stoffwechsel und der Proliferation von CLL-Zellen zu. Demnach führt ein extrazellulärer Argininmangel sowohl in der CLL-Zelllinie HG3 als auch in primären CLL-Zellen zu einer starken Abnahme der Proliferation [10]. Gleichzeitig steigt bei Arginin-Depletion der Anteil an apoptotischen und toten Zellen [10]. CLL-Zellen können diesen extrazellulären Argininmangel im Gegensatz zu physiologischen Zellen nicht durch eine Arginin-Synthese aus Citrullin kompensieren, da sie die Argininosuccinat-Synthetase (ASS) nicht exprimieren (Arginin-Auxotrophie) [10]. Die CLL-Zellen sind daher auf die Arginin-Aufnahme über verschiedene Transport-Systeme angewiesen. CLL-Zellen exprimieren dazu drei verschiedene Arginin-Transporter, den CAT-1, γ^+ LAT1, γ^+ LAT2 [10], wobei hiervon physiologisch nur der CAT-1 als Arginin-Importer fungiert. Bei Stimulation der primären CLL-Zellen über TLR9 kommt es zur Überexpression des CAT-1, was wiederum bedeutet, dass bei proliferierenden CLL-Zellen vor allem der

CAT-1-Transporter in die Zellmembran eingebaut wird [10]. Daraufhin etablierten wir zunächst ein CAT-1-k.o.-Modell in der CLL-Zelllinie HG3 und im weiteren Verlauf auch in einem induzierbaren CAT-1-k.o. murinen Tumor-Modell in vivo. In den HG3-Zellen zeigte sich eine starke Abnahme der Proliferation und der Viabilität bei CAT-1-k.o. [10]. In den HG3-CLL-Zellen in der Maus zeigte sich ein langsames Tumorwachstum und ein längeres Überleben bei CAT-1-k.o. [10]. CLL-Zellen sind daher in erheblichem Maße auf die Arginin-Zufuhr über den CAT-1-Transporter angewiesen. Umgekehrt könnte eine Blockade des Einbaus oder der Synthese des CAT-1 zu einer effizienten Inhibition des Wachstums und der Viabilität der CLL-Zellen führen.

2.3 Aminosäure-Transporter

Alle Zellen des menschlichen Körpers sind auf die Zufuhr von Aminosäuren angewiesen. Vor allem sogenannte essentielle Aminosäuren (Phenylalanin, Leucin, Methionin, Lysin, Isoleucin, Valin, Threonin, Tryptophan und Cystein) können von den Zellen nicht synthetisiert werden und müssen daher über die Nahrung aufgenommen und in die Zellen transportiert werden. Auch die semi-essentiellen Aminosäuren (Arginin, Histidin) können während Wachstumsphasen, bei Infektionen oder anderen Stressoren zu essentiellen Aminosäuren werden, da der Körper den Eigenbedarf dann nicht mehr decken kann.

In den Zellen sind die Aminosäuren die Bausteine der Proteinbiosynthese. Zudem dienen sie dem Aufbau von Energiereserven, der Synthese wichtiger Metabolite und als Signalmoleküle. Die Aufnahme der Aminosäuren in die Zellen erfolgt über Aminosäure-Transporter aus der sogenannten Superfamilie der „solute carrier proteins“ (SLC). Diese zählt zum aktuellen Zeitpunkt insgesamt 458 Transportproteine, die zu 65 Transporterfamilien zusammengefasst werden [51]. Die für den Arginin-Transport in Immun- und Tumorzellen verantwortlichen Transporter zählen dabei überwiegend zur SLC3- und SLC7-Familie. Mittlerweile sind bereits mehr als 60 Transporter der SLC-Familie bekannt, die für den Transport von Aminosäuren verantwortlich sind [37]. Die tumorspezifische Hochregulation einzelner Transportsysteme zur Aufnahme von Aminosäuren stellt dabei einen neuen Ansatz in der Tumorthherapie dar [52].

Die SLC7-Familie ist für den Großteil der durch die Zellmembran transportierten Aminosäuren verantwortlich. Man unterscheidet kationische Aminosäuren-Transporter (CATs) von den leichten bzw. katalytischen Untereinheiten der heteromeren Aminosäuren-Transporter (HATs). CATs und HATs ähneln sich in ihrem Aufbau - während HATs aus einem Protein mit 12 Transmembrandomänen bestehen, sind diese bei den CATs um zwei weitere Domänen zu insgesamt 14 Transmembrandomänen erweitert (durch Duplikation der Transmembrandomänen 11 und 12) [53] [51].

Bei den heteromeren Aminosäuren-Transportern (HATs) handelt es sich um Heterodimere, die aus einer schweren Untereinheit (Typ-II-Glykoproteine der SLC3-Familie, CD98) und einer leichten bzw. katalytischen Untereinheit (SLC7-Familie) aufgebaut und über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind [54]. Die leichte bzw. katalytische Untereinheit ist dabei jeweils für die Transportfunktion verantwortlich, während die schwere Untereinheit lediglich den Transport zur und den Einbau in die Zellmembran vermittelt [54].

Im Körper werden zwei schwere Untereinheiten der SLC3-Familie ausgebildet: rBAT (SLC3A1) und 4F2hc (SLC3A2). Diese Typ-II-Glykoproteine haben eine Transmembrandomäne und sind am intrazellulären N-Terminus glykosyliert. Der C-Terminus befindet sich extrazellulär. Während Transporter mit der 4F2hc-Untereinheit ubiquitär im Körper exprimiert werden, kommen Transporter mit der rBAT-Untereinheit (rBAT/b^{0,+}) lediglich in der apikalen Membran von epithelialen Zellen des Gastrointestinaltrakts oder von Zellen des proximalen Tubulus der Nieren vor [54]. In Tumorzellen und aktivierten lymphatischen Zellen wurde eine Überexpression der 4F2hc-Untereinheit nachgewiesen, weshalb eine Beteiligung der Transporter an verstärktem Zellwachstum und Zellproliferation diskutiert wird [54].

Bei den leichten bzw. katalytischen Untereinheiten unterscheidet man mehrere Transportsysteme, die zur SLC7-Familie gehören. Diese unterscheiden sich in den Aminosäuren, die sie bevorzugt transportieren, und sind in den verschiedenen menschlichen Organen unterschiedlich stark exprimiert. Der Transport der Aminosäuren erfolgt dabei Na⁺-unabhängig, lediglich die System y⁺L-Transporter katalysieren einen Na⁺-abhängigen Transport [54].

Bei den System L-Transportern unterscheidet man die katalytischen Untereinheiten LAT1 (SLC7A5) und LAT2 (SLC7A8). Diese liegen physiologisch jeweils als Heterodimer mit der schweren Untereinheit 4F2hc vor. Der LAT1-Transporter zeigt

eine hohe Affinität zu großen neutralen Aminosäuren (Tyrosin, Leucin, Isoleucin, Valin, Phenylalanin) und einigen Medikamenten (L-Dopa, Gabapentin) [54] [55] [56]. Die genannten Aminosäuren werden dabei vor allem aus den Zellen transportiert (Efflux). Dem LAT1-Transporter kommt eine entscheidende Bedeutung im Wachstum von Zellen zu, da er acht der neun essentiellen Aminosäuren transportieren kann [51]. Der Transporter ist vor allem in der Niere und dem zentralen Nervensystem stark exprimiert, wo er an der Ausbildung der Blut-Nieren- bzw. Blut-Hirn-Schranke beteiligt ist [57]. Zudem ist der LAT1 wichtig während der T-Zell-Differenzierung und hauptverantwortlich für den Aminosäuren-Transport in T-Zellen [58]. Außerdem zeigt sich auch bei vielen Tumorentitäten (sowohl in Tumor-Zelllinien als auch in primären Tumorzellen) eine verstärkte Expression des LAT1 [59]. Die LAT-Expression korreliert dabei mit der Zellproliferation und Angiogenese. Bei nicht-kleinzelligem Bronchial-CA, triple-negativem Mamma-CA und Prostata-CA dient die Expression von 4F2hc/LAT1 daher auch als prognostischer Faktor [60] [61] [62]. In Tumorzelllinien konnte durch einen LAT1-knockout eine verminderte Proliferation nachgewiesen werden [63]. Der LAT2 transportiert neben großen neutralen Aminosäuren auch kleine neutrale Aminosäuren. Zudem ist der LAT2 vor allem an der basolateralen Membran von renalen und intestinalen epithelialen Zellen exprimiert, wo er der Reabsorption bzw. Resorption wichtiger neutraler Aminosäuren dient [54].

Zu den System y^+L -Transportern zählen der y^+LAT1 (SLC7A7) und der y^+LAT2 (SLC7A6). Diese liegen ebenfalls in einem Heterodimer mit der schweren Untereinheit 4F2hc vor, wobei die System y^+L -Transporter die katalytischen Untereinheiten darstellen. Sowohl der y^+LAT1 als auch der y^+LAT2 katalysieren den Na^+ -unabhängigen Transport von kationischen Aminosäuren (Arginin, Lysin, Histidin) sowie den Na^+ -abhängigen Transport von neutralen Aminosäuren [54]. Die kationischen Aminosäuren werden dabei vor allem aus den Zellen transportiert (Efflux). Vor allem der y^+LAT2 zeigt dabei eine sehr hohe Affinität zur Aminosäure Arginin und ist ein entscheidender Transporter für den Transport von Arginin aus den Zellen [54]. Dabei nehmen die Zellen häufig im Gegenzug Glutamin und Na^+ auf. Der y^+LAT1 ist vorwiegend in der basolateralen Zellmembran von renalen und intestinalen Zellen exprimiert, wo er der Reabsorption kationischer Aminosäuren dient. Der y^+LAT2 hingegen wird vor allem im Gehirn, dem Herzen, den Hoden und der Niere exprimiert [54].

Ein weiteres System der leichten Untereinheiten der HATs ist das x_c^- -System. Dazu zählt der xCT-Transporter (SLC7A11), der physiologisch als Heterodimer mit der

schweren Untereinheit 4F2hc vorliegt. Der xCT katalysiert den Na⁺-unabhängigen Austausch von intrazellulärem Glutamat und extrazellulärem Cystin [54]. Dieser Transport ist im zentralen Nervensystem wichtig zur Glutamat-Homöostase sowie in Makrophagen zur Bereitstellung wichtiger Antioxidantien. In Makrophagen dient das aufgenommene Cystin der Bereitstellung von Cystein, das unter anderem für die Synthese von reduziertem Glutathion verwendet wird [54].

Zu den System asc-Transportern zählen die katalytischen Untereinheiten Asc-1 (SLC7A10) und Asc-2 (SLC7A12). Während die Asc-1-Untereinheit als Heterodimer mit der schweren Untereinheit 4F2hc vorliegt, ist die schwere Untereinheit beim Asc-2 noch unbekannt. Der Asc-1-Transporter katalysiert die Na⁺-unabhängige Aufnahme von Glycin, Alanin, Serin, Threonin, Cystin und Aminobuttersäure in die Zellen und erlaubt zudem den Transport von D-Isomeren (vor allem D-Serin). Dabei spielt er eine wichtige Rolle in der Regulation der Homöostase von Glutamat-Co-Agonisten (D-Serin, Glycin) im zentralen Nervensystem [54]. Die physiologische Funktion des Asc-2 ist noch unklar.

Ein weiteres System stellt das b^{0,+}-System dar, wozu die katalytische Untereinheit b^{0,+}AT (SLC7A9) gezählt wird. Diese liegt physiologisch als Heterodimer mit der schweren Untereinheit rBAT vor. Der Transporter dient dem Austausch von extrazellulären kationischen Aminosäuren und intrazellulären neutralen Aminosäuren. Er ist überwiegend im Bürstensaum des Tubulussystems der Niere und im Gastrointestinaltrakt exprimiert, wo er die Aufnahme von dibasischen Aminosäuren und Cystin vermittelt [54].

Neben den leichten bzw. katalytischen Untereinheiten zählen auch die kationischen Aminosäure-Transporter (CATs) zur SLC7-Familie. Diese Transporter sind für den Großteil des Transports kationischer L-Aminosäuren im Körper verantwortlich und vor allem in nicht-epithelialen Zellen exprimiert [33]. Dazu zählen die Aminosäuren Arginin, Lysin und Histidin. Die Transporter zeigen dabei vor allem eine hohe Affinität zu kationischen Aminosäuren mit längerer C-Domäne (z.B. Arginin, Lysin) [64]. Der Transport erfolgt dabei bei allen CATs Na⁺-unabhängig und weitestgehend pH-unabhängig (Ausnahme: CAT-2B) [33]. Die Transporter bestehen aus 14 Transmembrandomänen mit intrazellulärem N- und C-Terminus. Der N-Terminus ist dabei glykosyliert. Während CAT-1, CAT-2 und CAT-3 eine ähnliche Aminosäure-Sequenz vorweisen (58-59 % gleiche AS-Sequenz), unterscheidet sich der CAT-4 deutlich von erstgenannten Transportern und ein Arginin-Transport wurde für den

CAT-4 auch noch nicht nachgewiesen [33]. Auf den CAT-4 wird aus diesem Grund im Folgenden nicht weiter eingegangen.

Der CAT-1 wird mit Ausnahme der Leber ubiquitär exprimiert [33]. Die Menge des exprimierten Transporters ist jedoch von Gewebe zu Gewebe sehr unterschiedlich. Intrazellulär sind die CAT-1-Proteine überwiegend in Vesikeln lokalisiert, die bei entsprechender Stimulation zur Zellmembran transportiert werden. Der CAT-1 katalysiert den Na^+ - und pH-unabhängigen Transport von kationischen Aminosäuren in die Zellen [33]. Der Transporter zeigt eine hohe Affinität zu den Aminosäuren Homoarginin, Arginin und Lysin. Der Transport kann durch Transstimulation (hohe Konzentrationen der Aminosäuren im intrazellulären Raum) oder Hyperpolarisation der Zellmembran stimuliert werden [65]. Wie die anderen CAT-Proteine besteht der CAT-1 aus 14 Transmembrandomänen mit intrazellulär gelegenem N- und C-Terminus [33]. Eine Mutation von Glutamin zu Asparagin an Stelle 107 im intrazellulären Bereich der dritten Transmembrandomäne führte Untersuchungen zufolge zu einem Verlust der Transportaktivität [33]. Daher wird dieser Bereich als wichtiger Bestandteil der zentralen Transport-Pore angesehen.

Die Regulation der Expression des CAT-1 erfolgt über verschiedene transkriptionelle, translationelle und posttranslationelle Mechanismen, wobei die genauen Mechanismen noch nicht vollständig verstanden sind. Die Bedeutung des CAT-1-Transporters zeigt eine Untersuchung, in der nachgewiesen wurde, dass eine homozygote Deletion des CAT-1-Gens letal ist [66]. Der CAT-1-Transporter wird durch das SLC7A1-Gen kodiert. Das Gen enthält einen „TATA-less-Promoter“ und zahlreiche Aminosäuren-sensitive Elemente innerhalb des ersten Exons, wodurch eine Stimulation der Transkription erfolgen kann [33]. Wie bei Gliom-Zellen von Ratten gezeigt werden konnte, führt ein Aminosäure-Mangel zu einer gesteigerten Genexpression des CAT-1 sowie zu einer erhöhten mRNA-Stabilität und Translation [67]. Die Stimulation der Transkription erfolgt dabei über eine Aktivierung der GCN2-Kinase mit Phosphorylierung von $\text{eIF2}\alpha$. Darüber hinaus konnte durch die Phosphorylierung von $\text{eIF2}\alpha$ eine Stimulation der Translation in den Gliom-Zellen über IRES (internal ribosomal entry sequence) beobachtet werden. Ein weiterer Mechanismus der translationalen Regulation der CAT-1-Expression konnte in Leberzellen nachgewiesen werden. Dabei wurde die CAT-1-Expression durch microRNA (miR-122) reguliert [68].

Die CAT-2-Transporter existieren in zwei Isoformen: CAT-2A und CAT-2B. Dabei handelt es sich um Spleiß-Varianten, die sich nur in 42 Aminosäuren unterscheiden

[33]. Wie der CAT-1 transportieren auch die CAT-2-Transporter kationische Aminosäuren in die Zelle. Dabei zeigen sie jedoch eine deutlich geringe Affinität zu den kationischen Aminosäuren und eine geringe Transstimulierbarkeit [33]. Zudem erfolgt der Transport über den CAT-2B pH-abhängig. Bei pH-Werten $< 7,5$ kommt es zu einer stark gehemmten Transportfunktion. Während der CAT-2A vor allem in der Leber stark exprimiert wird, wird der CAT-2B vor allem bei hohen proinflammatorischen Zytokin-Spiegeln in die Zellmembranen eingebaut [33].

Der CAT-3-Transporter transportiert ebenfalls kationische Aminosäuren, zeigt aber wie die oben aufgeführten CAT-2-Transporter eine geringere Affinität zu diesen Aminosäuren als der CAT-1. Zudem lässt sich der CAT-3 nur wenig durch eine erhöhte, intrazelluläre Aminosäuren-Konzentration oder eine Hyperpolarisation der Zellmembran stimulieren. Der CAT-3 wird vor allem im Gehirn sowie im Thymus- und Brustdrüsengewebe exprimiert [33].

2.4 Signaltransduktionswege in CLL-Zellen

Die Regulation der intrazellulären CAT-1-Synthese in CLL-Zellen stellt den Gegenstand meiner Arbeit dar. Dafür habe ich drei zentrale Signaltransduktionswege in CLL-Zellen analysiert: den PI3K/Akt-Signalweg, den B-Zell-Rezeptor-Signalweg und den NF- κ B-Signalweg.

2.4.1 Der PI3K/Akt-Signalweg

Der PI3K/Akt-Signalweg stellt einen der zentralen Signalwege in allen Zellen des Körpers dar. Dabei ist er wesentlich an der Regulation von Wachstum und Proliferation, der Hemmung der Apoptose, der Regulation des Stoffwechsels und der Interaktion mit anderen Signalwegen beteiligt [69].

Eine Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs erfolgt über extrazelluläre Stimuli, die überwiegend an Rezeptortyrosinkinasen (RTKs), Serin-/Threoninkinasen oder G-Protein-gekoppelte Rezeptoren der Zelloberfläche binden. Häufige extrazelluläre Stimuli sind dabei unter anderem Wachstumsfaktoren (wie EGF, IGF-1 oder PDGF), aber auch zahlreiche andere Substrate (Chemokine, Zytokine, uvm.) können zu einer Aktivierung dieses Signalwegs führen [70]. Intrazellulär kommt es zu einer Aktivierung der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K). Die PI3K-1A und PI3K-2 werden dabei bei RTK-Stimulation aktiviert, während eine Aktivierung der PI3K-1B vor allem nach Stimulation von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren stattfindet. Zusätzlich ist eine Aktivierung der

PI3K-3 durch eine extrazelluläre Stimulation durch Aminosäuren möglich. Die PI3K-1A/B bestehen aus einer regulatorischen und einer katalytischen Untereinheit, die PI3K-2/3 lediglich aus einer katalytischen Untereinheit. Die Aktivität der PI3K wird zusätzlich intrazellulär durch die Interaktion mit Mitgliedern der Ras-Familie reguliert [71] [72].

Nach Aktivierung der PI3K phosphoryliert diese membrangebundenes Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2), wodurch Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP_3) entsteht. Die Proteinkinase B (auch Akt genannt), die an ihrem N-Terminus eine Pleckstrin-Homologie-Domäne (kurz PH-Domäne) enthält, kann dadurch an membrangebundenes PIP_3 binden, wodurch es zu einer Konformationsänderung von Akt kommt. Die PH-Domäne ermöglicht dabei die Interaktion mit verschiedenen Lipiden der Zellmembran [73]. Neben der N-terminalen PH-Domäne besteht Akt aus einer zentralen Kinase-Domäne (mit einer Threonin-308-Phosphorylierungsstelle) und einer C-terminalen hydrophoben Region (mit einer Serin-473-Phosphorylierungsstelle). Bei Akt handelt es sich um eine sogenannte Serin-Threonin-Kinase, da sie Substrate an ihrem Serin- oder Threonin-Rest phosphorylieren kann. Intrazellulär unterscheidet man drei verschiedene Isoformen (Akt 1-3), die in ihrer Aminosäure-Sequenz zu 80 % übereinstimmen. Alle Isoformen ermöglichen dabei die Phosphorylierung von Substraten mit dem Konsensusmotiv $\text{R-X-R-X-X-S/T-}\phi$ (R = Arginin, X = beliebige Aminosäure, ϕ = hydrophober Rest) [74]. Durch die Konformationsänderung nach Bindung an PIP_3 wird die Threonin-308-Phosphorylierungsstelle im Bereich des T-Loops der katalytischen Kinase-Domäne freigelegt. In der Folge ist eine Phosphorylierung durch die PDK1 (phosphoinositide-dependent protein kinase-1) möglich, die sich ebenfalls an membrangebundenes PIP_3 anlagert. Durch die Phosphorylierung an Threonin-308 kommt es wiederum zu einer Konformationsänderung von Akt, wodurch die zweite Phosphorylierungsstelle im Bereich des C-Terminus freigelegt wird. Diese Phosphorylierung an Serin-473 erfolgt durch den mTORC2-Komplex. Die Aktivität dieses Proteinkomplexes ist dabei abhängig von der extrazellulären Stimulation der Zelle durch Wachstumsfaktoren und der Aktivität der PI3K. Durch die Phosphorylierung an Serin-473 wird die Phosphorylierung an Threonin-308 zusätzlich stabilisiert und die Aktivität von Akt gesteigert [75]. Die Phosphorylierung beider Aminosäure-Motive ist dabei für die maximale Aktivierung von Akt entscheidend [75]. Nach der zweimaligen Phosphorylierung von Akt kommt es zum Ablösen von der Zellmembran, wodurch Akt verschiedene Substrate mit Hilfe der Kinase-Domäne phosphorylieren kann.

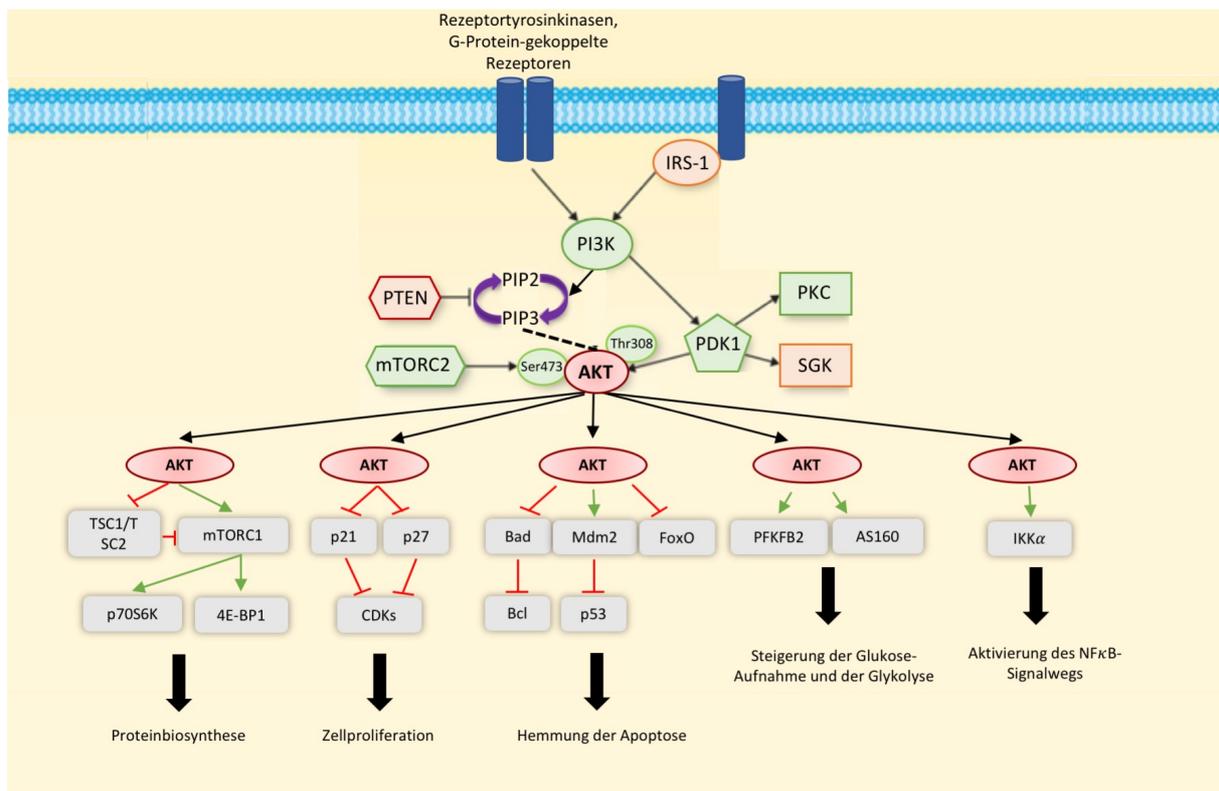


Abbildung 5: Schema des PI3K/Akt-Signalwegs.
 Erläuterungen im Text (modifiziert nach Jansen et al., 2016 [76])

Akt ist an zahlreichen Prozessen in den Zellen beteiligt. Bisher wurden mehr als 100 verschiedene Substrate von Akt detektiert, was die zentrale Rolle in der intrazellulären Signaltransduktion widerspiegelt [69]. Durch die Phosphorylierung von Substraten am R-X-R-X-X-S/T- ϕ -Motiv kann Akt sowohl zu einer Inhibition als auch zu einer Stimulation des Substrats führen [72]. Damit vermittelt Akt zahlreiche Funktionen im Wachstum und der Proliferation der Zellen, in der Hemmung der Apoptose, der Regulation des Stoffwechsels und der Regulation anderer Signalwege. Welche Substrate dabei bevorzugt von Akt durch Phosphorylierung reguliert werden, ist dabei abhängig vom Zelltyp, der Dauer und der Intensität der Akt-Aktivierung [72].

Akt stimuliert das Zellwachstum durch eine Aktivierung der Proteinbiosynthese. Diese Aktivierung erfolgt dabei häufig nach Bindung von Wachstumsfaktoren an Rezeptortyrosinkinasen. Akt stimuliert die Proteinbiosynthese über eine Aktivierung des mTORC1-Komplexes. Bei hohen Aminosäuren-Konzentrationen in den Zellen werden mTORC1-Komplexe durch verschiedene Rag-Proteine an die Oberfläche von Lysosomen transportiert. Dort befinden sich sogenannte TSC-Komplexe (TSC1/TSC2) mit einer GTPase-Aktivität (Rheb). Akt katalysiert dabei die Phosphorylierung von TSC2, wodurch sich der TSC-Komplex von der Oberfläche der Lysosomen ablöst und die mTORC-1-Komplexe aktiviert werden. Diese führen wiederum über die p70S6K

und 4E-BP1 zu einer Stimulation der Proteinbiosynthese. Zusätzlich wird durch diesen Mechanismus die Autophagie in den Zellen gehemmt [77] [78].

Darüber hinaus vermittelt Akt zahlreiche Prozesse, welche die Proliferation der Zellen stimulieren und gleichzeitig die Apoptose der Zellen hemmen. Zu den von Akt phosphorylierten Substraten gehört dabei unter anderem auch die Glykogensynthase-Kinase-3 (GSK3), die das erste bekannte Substrat von Akt darstellte [79]. Durch die Phosphorylierung der GSK3 wird dieses ansonsten konsekutiv aktivierte Enzym inaktiviert, wodurch verschiedene Substrate der GSK3 nicht mehr phosphoryliert werden können. Dazu zählen unter anderem MCL-1 und der Transkriptionsfaktor c-Myc. Durch die aufgehobene Kinase-Aktivität der GSK3 können diese Substrate nicht mehr phosphoryliert und dadurch nicht mehr in den Proteasomen abgebaut werden, wodurch die Proliferation der Zellen stimuliert wird [80] [81]. Darüber hinaus vermittelt Akt die Phosphorylierung von FoxO-Transkriptionsfaktoren. Durch die Phosphorylierung der FoxO-Transkriptionsfaktoren werden diese aus dem Zellkern ins Zytosol transportiert und damit inaktiviert. In der Folge kommt es unter anderem zu einer verminderten Transkription von p21 und p27, wodurch intrazelluläre Cyclin-abhängige Kinasen (Cyclin-dependent kinases, CDKs) enthemmt werden und die Proliferation der Zellen zusätzlich verstärkt wird [82]. Zudem wird die Transkription und Translation zahlreicher weiterer Proteine, welche die Apoptose induzieren (BIM/PUMA) oder das Wachstum der Zellen hemmen (Sestrin3, MAP1LC3B, BNIP3), inhibiert [83]. Diese und zahlreiche weitere Mechanismen tragen zu einer verstärkten Proliferation der Zellen nach Aktivierung des PI3K-Akt-Signalwegs bei.

Neben dem Einfluss auf das Zellwachstum und die Zellproliferation ist der PI3K-Akt-Signalweg auch an der Regulation des Stoffwechsels beteiligt. Über eine Aktivierung von PFKFB2 und AS160 führt Akt zu einer Steigerung der Glukose-Aufnahme in die Zellen und einer verstärkten Glykolyse [84].

Zudem interagiert der PI3K-Akt-Signalweg mit zahlreichen anderen Signalwegen innerhalb der Zelle. Häufige Interaktionen treten dabei mit dem RAS-ERK-Signalweg und dem AMPK-Signalweg auf, wobei in der Literatur auch von einer Interaktion mit dem NF- κ B-Signalweg berichtet wird [85]. Akt führt durch eine Phosphorylierung von c-Raf zu dessen Inhibition und hemmt die weitere Signalübertragung über ERK [86]. Eine hohe Aktivität des PI3K-Akt-Signalwegs geht deshalb mit einer verminderten Aktivität des RAS-ERK-Signalwegs einher. Beim AMPK-Signalweg führt Akt durch Phosphorylierung von AMPK zu einer verminderten Aktivierung des Signalwegs [87]. Das lässt sich unter anderem damit begründen, dass beide Signalkaskaden in der

Regulation intrazellulärer Signalwege eine divergente Wirkung entfalten. Während der PI3K-Akt-Signalweg über eine gesteigerte Glukose-Aufnahme und Glykolyse zu einer anabolen Stoffwechsellage mit verstärkter Proteinbiosynthese führt, kommt es im Zuge des AMPK-Signalwegs zu einer katabolen Stoffwechsellage mit ATP-Gewinnung.

Aufgrund der starken Auswirkungen auf Zellwachstum und Zellproliferation bedarf es intrazellulär einer effizienten Regulation der Aktivität des PI3K-Akt-Signalwegs. Dazu gibt es zahlreiche Feedback-Mechanismen, die den Signalweg bereits innerhalb einer Stunde nach Aktivierung wieder hemmen. Der wichtigste Inaktivierungsmechanismus stellt dabei die Dephosphorylierung von PIP₃ durch die PTEN (Phosphatase and tensin homolog) dar [88] [89]. In der Folge kann Akt nicht mehr mit Hilfe der N-terminalen PH-Domäne an die Zellmembran binden und aktiviert werden. Weitere wichtige Inaktivierungsmechanismen stellen die Desphosphorylierungen von Akt an den Phosphorylierungsstellen (Threonin-308, Serin-473) dar. Diese Dephosphorylierungen können durch verschiedene intrazelluläre Enzyme katalysiert werden, die als sogenannte Akt-Phosphatasen bezeichnet werden. Dazu zählen unter anderem die PP2A (Proteinphosphatase 2A), die eine Dephosphorylierung an Threonin-308 bewirkt, sowie die PHLPP1/2 (PH domain and leucine rich repeat Protein Phosphatase), welche die Dephosphorylierung an Serin-473 katalysieren [70] [90].

Aufgrund der starken Wirkung auf Zellwachstum und Zellproliferation ist der PI3K-Akt-Signalweg Gegenstand zahlreicher Untersuchungen in Tumorzellen [91]. Bei vielen Tumorentitäten zeigen sich verschiedene Mutationen, die zu einer Hyperaktivität des Signalwegs führen. Mögliche Mutationen können dabei zum Beispiel eine loss-of-function-Mutation im PTEN-Gen oder eine gain-of-function-Mutation der PI3K [92] sein. PTEN-Mutationen sind bereits in verschiedenen Tumorentitäten beschrieben (Endometrium-CA, Glioma-Zellen, kolorektales CA, malignes Melanom, Prostata-CA) [93]. Neben den oben genannten Mutationen im PTEN- oder PI3K-Gen sind auch zahlreiche weitere Substrate des PI3K-Akt-Signalwegs potentielle Onkogene oder Tumorsuppressorgene, welche bei Mutation zu einer verstärkten Akt-Aktivierung führen können. Auch eine Mutation in der PH-Domäne von Akt (E17K) mit konsekutiver Kinase-Aktivität kann zu einer Tumorentstehung beitragen, wie in Untersuchungen bei Mamma-CA gezeigt werden konnte [94]. Zudem wird eine Hyperaktivität des PI3K-Akt-Signalwegs mit einer Chemotherapie-Resistenz assoziiert. Wie in einer Studie gezeigt wurde, kommt es im Rahmen einer Chemotherapie mit Cisplatin zu einer verstärkten

Aktivierung von Akt mit Phosphorylierung des antiapoptotischen Substrats BAD. Die Apoptose in den Tumorzellen wird daraufhin gehemmt [95] [75].

Eine Hyperaktivität des PI3K-Akt-Signalwegs ist entscheidend für die Proliferation und das Wachstum von Zellen der Chronischen Lymphatischen Leukämie (CLL). So konnte bereits gezeigt werden, dass es durch eine Hemmung des PI3K-Akt-Signalwegs in CLL-Zellen zu einem verminderten Zellüberleben kommt [96]. Mutationen im PI3K-Akt-Signalweg sind dabei jedoch eher selten. PTEN-loss-of-function-Mutationen oder PI3K-gain-of-function-Mutationen sind bei CLL nur sehr selten beschrieben [97]. Die CLL-Zellen sind stark abhängig von der Aktivierung des PI3K-Akt-Signalwegs über den B-Zell-Rezeptor. Diese Aktivierung des B-Zell-Rezeptors erfolgt über verschiedene Substrate aus dem Tumormikromilieu oder durch autokrine B-Zell-Rezeptor-Stimulierung, wodurch es intrazellulär häufig zu einer Aktivierung des Onkogens TCL1 (T-Zell-Leukämie 1-Onkogen) kommt, welches in 80 - 90 % der CLL-Zellen exprimiert wird. TCL1 führt durch eine direkte Interaktion zu einer Aktivierung der Proteinkinase B und stimuliert dadurch die Proliferation und das Wachstum der Zellen [98]. Daneben kann der PI3K-Akt-Signalweg auch durch zahlreiche andere Substrate aktiviert werden wie Zytokine, Chemokine oder Adhäsionsmoleküle.

2.4.2 Der NF- κ B-Signalweg

Der NF- κ B-Signalweg ist ein weiterer zentraler Signalweg, der in allen Zelltypen des Menschen vorkommt. Eine Aktivierung dieses Signalwegs tritt vor allem im Rahmen der angeborenen und erworbenen Immunabwehr, bei Entzündungen oder akuten Stressreaktionen auf [99], aber auch verschiedene Tumorentitäten zeigen eine dauerhaft gesteigerte Aktivität des NF- κ B-Signalwegs [100] [101] [102]. Dabei wird die Regulation zahlreicher Gene durch den im Zytoplasma befindlichen, in der Regel inaktiven Transkriptionsfaktor NF- κ B gesteuert.

Man unterscheidet fünf verschiedene NF- κ B-Proteine, die zur Familie der Rel-Proteine gehören: NF- κ B1 (p50 und das Vorläuferprotein p105), NF- κ B2 (p52 und das Vorläuferprotein p100), c-Rel, RelA (p65) und RelB. Diese liegen in den meisten Zellen inaktiv im Zytoplasma vor, lediglich in Antikörper-produzierenden B-Lymphozyten, aktiven T-Zellen und Makrophagen sind sie dauerhaft im Zellkern aktiviert [103]. Die fünf NF- κ B-Proteine besitzen jeweils eine hochkonservierte, N-terminale „Rel-homology domain“ (RHD), bestehend aus einer Sequenz von 300 Aminosäuren, und sind damit strukturell eng verwandt. Die RHD ist die für die Funktion der NF- κ B-

Proteine entscheidende Struktur. Sie ist maßgeblich an der Dimerisierung von NF- κ B-Proteinen beteiligt, vermittelt aber gleichzeitig auch die Bindung an den DNA-Strang sowie die Interaktion mit den I κ B-Proteinen. Sie besteht aus Immunglobulin-ähnlichen Strukturen, die über eine linker-Region verbunden sind. Im Bereich der RHR befindet sich darüber hinaus eine nukleäre Lokalisationssequenz (NLS), die für den Transport der Transkriptionsfaktoren in den Zellkern entscheidend ist. Die fünf NF- κ B-Proteine unterscheiden sich jedoch in ihrem C-Terminus [104] [99].

Normalerweise liegen die NF- κ B-Proteine inaktiv im Zytoplasma vor. Diese Inaktivierung erfolgt über I κ B-Proteine, die an der RHD der NF- κ B-Proteine binden und damit die Dimerisierung und den Transport der Transkriptionsfaktoren in den Zellkern verhindern. Man unterscheidet insgesamt acht verschiedene I κ B-Proteine: I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ , Bcl-3, die Vorläuferproteine der NF- κ B-Proteine 1/2 (p105 und p100) sowie das Drosophila-Protein-Cactus. Diese Proteine enthalten jeweils sechs bzw. sieben Ankyrin-Wiederholungen, mit deren helikalen Domänen sie an die RHD der NF- κ B-Proteine binden und die nukleäre Lokalisationssequenz (NLS) verdecken. Dadurch wird einerseits die Dimerisierung der NF- κ B-Proteine verhindert, andererseits können die Transkriptionsfaktoren nicht in den Zellkern aufgenommen werden [105]. Neben der Inaktivierung der NF- κ B-Proteine spielen die I κ B-Proteine auch eine entscheidende Rolle in der Termination der NF- κ B-Aktivität. Nach der Signaltransduktion über NF- κ B und der vermehrten Expression von NF- κ B-abhängigen Genen wandern I κ B α -Proteine in den Zellkern und binden an NF- κ B, wodurch sich diese von ihren Zielgenen an der DNA lösen. In der Folge vermittelt I κ B α den Rücktransport der NF- κ B-Proteine ins Zytoplasma, da es eine nukleäre Exportsequenz (NES) auf der Oberfläche trägt [106].

Zahlreiche extrazelluläre Stimuli können zu einer Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs führen. Neben proinflammatorischen Zytokinen (TNF α , IL-1), Wachstumsfaktoren sowie Bakterien- oder Virusantigenen kann auch physikalischer (ionisierende Strahlung, UV-Licht) oder chemischer Stress (Chemotherapeutika) zu einer Aktivierung des Signalwegs führen. Dabei binden die oben genannten Faktoren an unterschiedliche Rezeptoren der Zelloberfläche. Dazu zählen verschiedene Zytokin-Rezeptoren (TNF α -Rez., IL-1-Rez.), der B-Zell-Rezeptor, der Toll-like-Rezeptor (TLR) sowie zahlreiche Wachstumsfaktor-Rezeptoren [107] [104]. Nach der Bindung des jeweiligen Substrates kommt es intrazellulär zu einer Aktivierung verschiedener Adaptor- und Effektormoleküle, die eine Aktivierung weiterer Kinasen bewirken. Je nach Stimulus können dem NF- κ B-Signalweg so noch weitere Signalwege

vorgeschaltet sein, welche die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs bewirken (unter anderem auch der PI3K-Akt-Signalweg oder B-Zell-Rezeptor-Signalweg). Letztendlich münden alle Signalwege jedoch in einer Aktivierung des I κ B-Kinase-Komplexes (IKK) [108]. Dieser Komplex besteht aus drei Proteinen: IKK α , IKK β , IKK γ (auch als NEMO bezeichnet, *NF- κ B essential modifier*). Während IKK α und IKK β jeweils eine N-terminale Proteinkinase-Domäne besitzen, mit der sie die Phosphorylierung der I κ B-Proteine katalysieren, stellt IKK γ lediglich einen essentiellen Modulator zur Aktivierung von NF- κ B dar. Ohne die IKK γ -Untereinheit sind der I κ B-Abbau sowie die NF- κ B-Aktivierung nicht möglich. Der IKK-Komplex ist ein Multiproteinkomplex mit einer molekularen Masse von 700 - 900 kDa. Eine Dimerisierung von IKK α und IKK β ist essentiell für die Aktivierung des Komplexes. Während IKK α vor allem eine große Rolle in der körperlichen Entwicklung (unter anderem in der epidermalen Differenzierung) spielt, ist IKK β vor allem an der Signaltransduktion nach Bindung proinflammatorischer Stimuli beteiligt [109]. Nach Aktivierung des IKK-Komplexes kommt es zu einer Phosphorylierung der an NF- κ B gebundenen I κ B-Proteine. Die Phosphorylierungsstellen befinden sich bei I κ B α bei Serin-32 und Serin-36 und bei I κ B β bei Serin-10 und Serin-23 [110]. Durch die Phosphorylierung kommt es zur Polyubiquitinierung der I κ B-Proteine an Lysin-21/22 durch SKp1-Cullin-F-box-Typ 3, wodurch die I κ B-Proteine für den schnellen proteolytischen Abbau in 26S-Proteasomen markiert werden [111] [99]. Nach dem proteolytischen Abbau der I κ B-Proteine dimerisieren die NF- κ B-Proteine. Dabei bilden sich am häufigsten Heterodimere aus einer p65- (RelA) und einer p50-Untereinheit (p65:p50-Heterodimere) [112]. Mit Hilfe der NLS-Sequenz werden die NF- κ B-Proteine in den Zellkern transportiert und vermitteln dort die Transkription verschiedener Gene. Diese Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs durch Aktivierung des IKK-Komplexes wird auch als klassischer NF- κ B-Signalweg bezeichnet, wie er vor allem im Rahmen von Entzündungen und Infektionen auftritt.

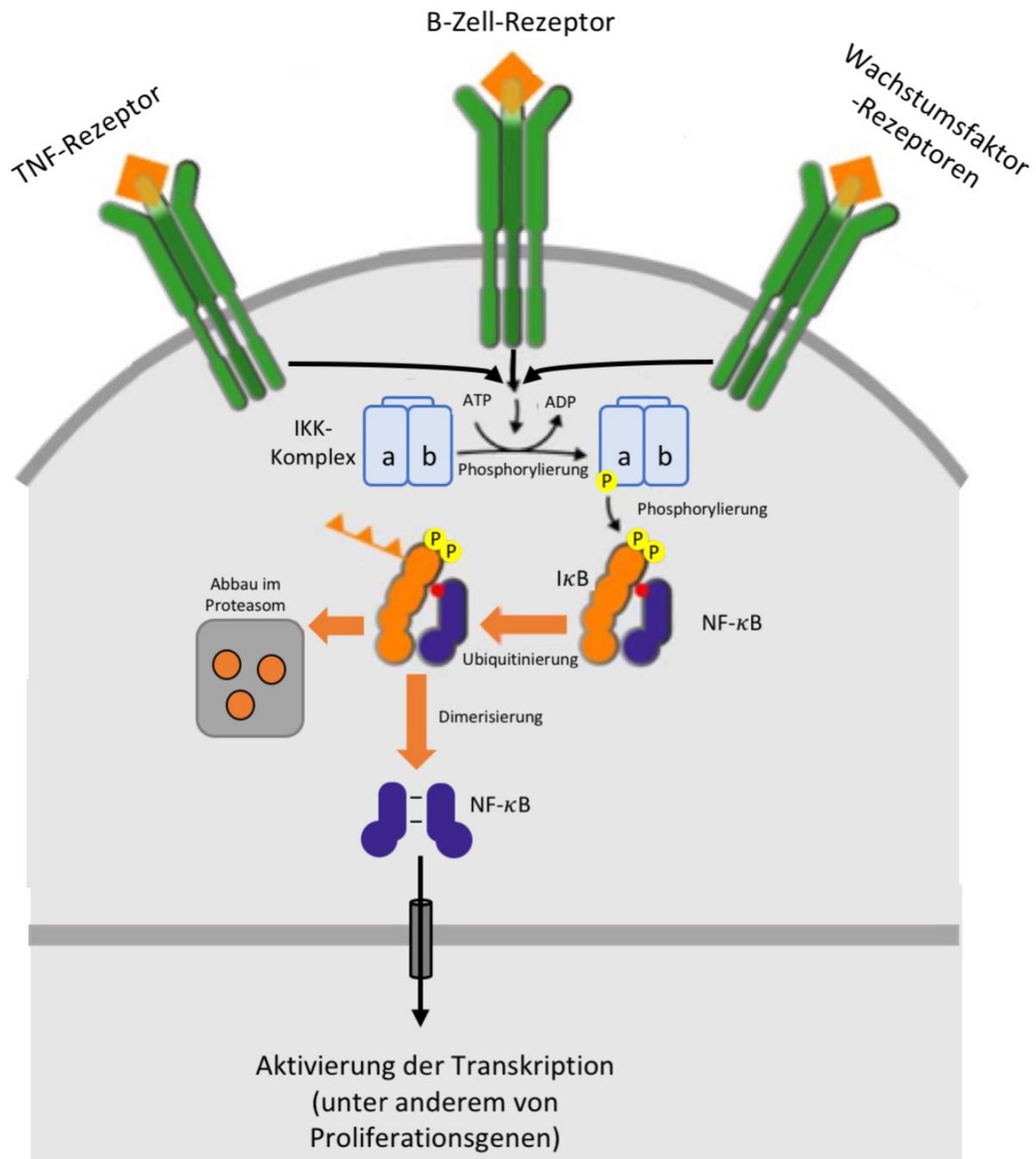


Abbildung 6: Schema des NF-κB-Signalwegs.
 Erläuterungen im Text (modifiziert nach [113])

Je nach Zelltyp und Stimulus kann es aber auch über die Aktivierung einer NF-κB-induzierenden Kinase (NIK) zu einer Aktivierung von NF-κB kommen (alternativer NF-κB-Signalweg) [114]. Diese Form der NF-κB-Aktivierung spielt vor allem bei der Entwicklung lymphatischer Organe und der B-Zell-Reifung eine entscheidende Rolle und trägt nur einen unwesentlichen Teil bei Entzündungsreaktionen und im Rahmen der Immunabwehr bei. Dabei kommt es nach Bindung eines Stimulus (CD40-Ligand, BAFF, $LT\beta$, RANKL) an verschiedene Oberflächenrezeptoren zu einer Aktivierung der NIK. Diese führt wiederum durch Phosphorylierung zu einer Aktivierung von $IKK\alpha$, das

den Abbau des NF- κ B2-Vorläuferproteins p100 zu p52 einleitet. In der Folge kommt es intrazellulär zu einer Dimerisierung von p52 mit RelB. Dieser Transkriptionsfaktor wandert in den Zellkern und führt zur Expression der durch NF- κ B-kontrollierten Gene [99]. Während der klassische NF- κ B-Signalweg schnell auf zahlreiche verschiedene Reize reagieren kann, zeigt der alternative Weg lediglich eine verzögerte Genexpression bei spezifischen, extrazellulären Stimuli.

Eine Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs erfolgt im Rahmen zahlreicher entzündlicher Prozesse sowie bei Infektionen mit Aktivierung der angeborenen und erworbenen Immunabwehr. Oftmals kommt es dabei zu einer Stimulation des Zellüberlebens sowie der Proliferation und einer gleichzeitigen Hemmung der Apoptose der Zellen [99]. Dabei haben Untersuchungen unter anderem gezeigt, dass es bei p50-defizienten Mäusen zu einer gestörten B-Zell-Proliferation kommt. Zudem zeigten die Mäuse nach Stimulation mit ausgewählten Mitogenen einen Zellzyklus-Block in der G1-Phase mit einer deutlich erhöhten Apoptoserate [115]. Dies verdeutlicht die entscheidende Wirkung des NF- κ B-Signalwegs (vor allem von NF- κ B1/p50) in der Regulation der Proliferation und Hemmung der Apoptose in Zellen der angeborenen und erworbenen Immunabwehr. Darüber hinaus kommt dem NF- κ B-Signalweg eine bedeutende Rolle im Rahmen von entzündlichen Prozessen zu. Die NF- κ B-Proteine regulieren dabei die Genexpression zahlreicher proinflammatorischer Gene [116]. Gleichzeitig wurde bei zahlreichen entzündlichen Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen eine erhöhte Aktivität des NF- κ B-Signalwegs festgestellt (z.B. bei rheumatoider Arthritis, Atherosklerose oder multipler Sklerose) [117] [118] [119].

In zahlreichen Tumorentitäten zeigt sich ebenfalls eine dauerhaft erhöhte NF- κ B-Aktivität, da der NF- κ B-Signalweg maßgeblich an der Proliferation der Zellen beteiligt ist. Dabei führt er neben einer Hemmung der Apoptose zur Bildung von Wachstumsfaktoren sowie zur Synthese von Adhäsions- und Invasionsproteinen, welche die weitere Ausbreitung der Tumore begünstigen [120] [121]. Eine erhöhte NF- κ B-Aktivität wurde unter anderem in Zellen der Akuten Lymphatischen Leukämie (ALL), des Burkitt-Lymphoms, des Hodgkin-Lymphoms und der CLL nachgewiesen [100] [101] [122] [123]. Auch beim kolorektalen Karzinom, dem Mamma-CA und dem Multiplen Myelom wurde eine dauerhaft erhöhte NF- κ B-Aktivität gezeigt [102] [124] [125]. In einem Teil der genannten Tumoren kommt es im Rahmen einer chronischen Entzündung zu einer erhöhten NF- κ B-Aktivität, die eine verstärkte Proliferation und den Übergang einer prä-malignen Läsion in einen malignen Tumor begünstigt. Dieser Übergang erfolgt dabei oft über die verstärkte Expression von Genen, welche die

Apoptose hemmen (TRAF1/2, cFLIP, Bcl-2, Bcl-xL), den Zellzyklus stimulieren (Zyclin D1, CDK2, c-myc, COX-2) und durch die Synthese von Wachstumsfaktoren (TNF α , IL-1 β , IL-6) und Proteinen, die an der Migration und Invasion (ICAM-1, VCAM-1, ELAM1, Matrix-Metalloproteinasen, Urokinase-Plasminogen-Aktivator) sowie der Angiogenese (VEGF, bFGF, TGF- β) des Tumors beteiligt sind [126] [127] [128] [129] [130] [131]. Wie es letztendlich zur Entkopplung des NF- κ B-Signalwegs von seinen normalen intrazellulären Regulationsmechanismen kommt, ist dabei noch unklar. Eine Aktivierung von Onkoproteinen, die mit einer dauerhaften Stimulation des IKK-Komplexes einhergeht, oder eine Assoziation mit zahlreichen Mutationen (z.B. N-Ras, B-Raf, PTEN) wird diskutiert [132].

In CLL-Zellen zeigt sich, wie bereits erwähnt, im Vergleich zu naiven B-Zellen ebenfalls eine dauerhaft gesteigerte Aktivität des NF- κ B-Signalwegs [123]. Der NF- κ B-Signalweg spielt dabei in den Tumorzellen eine entscheidende Rolle im Fortschreiten der Erkrankung. Wie es bei der CLL zu der dauerhaft gesteigerten Aktivität des Signalwegs kommt, ist noch unklar. Nur in seltenen Fällen (jeweils weniger als 5 % der Patienten) konnten einzelne Mutationen (z.B. BIRC3, MYD88, NFKBIE) nachgewiesen werden, die eine dauerhafte Aktivierung bedingen [123]. Im Vergleich finden sich bei anderen B-Zell-Lymphomen häufig zahlreiche, für die erhöhte NF- κ B-Aktivität verantwortliche Mutationen. CLL-Zellen sind hingegen stark abhängig vom Tumormikromilieu. Dies wird dadurch verdeutlicht, dass primäre CLL-Zellen bei in-vitro-Kultivierung innerhalb kurzer Zeit durch Apoptose sterben [133]. Die Stimulation der CLL-Zellen durch extrazelluläre Substrate und Antigene ist daher für die Viabilität und die Proliferation der Tumorzellen entscheidend. Dabei kommt es häufig durch eine Substratbindung an Oberflächenrezeptoren (vor allem B-Zell-Rezeptor, Toll-like-Rezeptor, CD40-Rezeptor) zu einer Aktivierung des IKK-Komplexes und einer Steigerung der NF- κ B-Aktivität [123].

2.4.3 Der B-Zell-Rezeptor-Signalweg

B-Lymphozyten tragen auf ihrer Zelloberfläche den B-Zell-Rezeptor (BZR), der aus einem membranständigen Immunglobulin und zwei Transmembranproteinen (CD79a/CD79b) aufgebaut ist [134]. Der BZR ist an sämtlichen Funktionen der B-Zellen beteiligt. Während der Entwicklung der B-Zellen im Knochenmark vermittelt er sowohl die positive als auch die negative Selektion, indem er nach Bindung von Antigenen intrazellulär die Proliferation oder die Apoptose der Zellen stimuliert [135]. In reifen B-Zellen vermittelt er nach Bindung eines Antigens die Differenzierung zu Plasmazellen, die im Rahmen einer Immunreaktion Antikörper gegen spezifische Antigene sezernieren [136]. Neben der Antikörper-Synthese dient der BZR jedoch auch der Aufnahme von Antigenen mittels Endozytose, die im Anschluss über MHC-II-Proteine an der Oberfläche von B-Zellen präsentiert werden können. Dadurch können T-Lymphozyten im Rahmen einer Immunreaktion aktiviert werden [137].

Im Gegensatz zu T-Lymphozyten können B-Zellen mithilfe des BZR freie (im Extrazellularraum befindliche) Antigene binden. Diese Bindung erfolgt mit Hilfe des an der Oberfläche befindlichen, membranständigen Immunglobulins, welches aus einer schweren und einer leichten Kette aufgebaut ist. Durch somatische Rekombination innerhalb der Gene, die für die Antigen-Bindestelle der schweren (V, D, J-Gensegmente) und leichten Kette (V, J-Gensegmente) kodieren, können die membranständigen Immunglobuline mehrere Millionen verschiedener Antigene erkennen. Diese Spezifität wird durch somatische Punktmutationen nochmals verstärkt, welche die Affinität zu einem Antigen verstärken [138]. Das membranständige Immunglobulin befindet sich an der Zelloberfläche in einem Multiproteinkomplex mit einem Heterodimer aus den Transmembranproteinen CD79a (auch $Ig\alpha$ genannt) und CD79b (auch $Ig\beta$ genannt), die über eine Disulfidbrücke verknüpft sind. Das Immunglobulin und die Transmembranproteine sind dabei jedoch nicht-kovalent miteinander verbunden. An der Zelloberfläche von B-Zellen liegen diese Multiproteinkomplexe gruppiert vor, damit sie nach der Bindung eines Antigens an das Immunglobulin schnell aggregieren können (Kreuzvernetzung der BZR) [139]. Durch diese Aggregation kommen die zytoplasmatischen Domänen von CD79a und CD79b in Kontakt und werden an zwei Tyrosin-Resten im Bereich ihrer ITAM-Sequenzmotive (ITAM = immunoreceptor tyrosine-based activation motif) durch Kinasen der Src-Familie (Lyn, Fyn, Blk) phosphoryliert [140]. Dabei kommt Lyn eine besondere Bedeutung zu. So kommt es bei einer loss-of-function-Mutation oder einem Fehlen von Lyn zu einer gestörten BZR-Signaltransduktion [141]. Durch die Phosphorylierung der

ITAM-Sequenzen der Heterodimere können weitere Kinasen über ihre SH2-Domänen binden. Dazu zählt unter anderem auch die Syk-Kinase, die die Signalweiterleitung um ein Vielfaches verstärkt [142]. Nach Bindung von Syk an die ITAM-Sequenzen werden diese phosphoryliert und ihre Kinase-Funktion aktiviert. In der Folge kommt es zur Anlagerung und Phosphorylierung von Adaptorproteinen (BLNK, Nck, NTAL, uvm.), die den Kontakt zwischen den Protein-Tyrosin-Kinasen (PTKs) und intrazellulären Signalmolekülen vermitteln. Das Adaptorprotein BLNK ermöglicht die Anlagerung von BTK, welches zusätzlich an membranständiges PIP₃ gebunden ist, an die Heterodimere des BZRs [143]. Das Adaptorprotein Nck führt über die Rekrutierung von BCAP zur Aktivierung der PI3K, die PIP₂ zu PIP₃ phosphoryliert [144]. In der Folge können zahlreiche Proteine über ihre PH-Domäne an PIP₃ binden und sich den Heterodimeren des BZRs anlagern. Dazu zählt neben der bereits erwähnten BTK auch die Proteinlipase PLC γ 2, Akt und PDK1. Durch die Assoziation von Akt und PDK1 kommt es zur Phosphorylierung von Akt an der Phosphorylierungsstelle Threonin-308 und zur Einleitung des Akt-Signalwegs [145]. Durch die Src-Kinase Lyn und die Syk-Kinase kommt es zur Phosphorylierung von BTK zu pBTK, welches wiederum die Phosphorylierung von PLC γ 2 zu pPLC γ 2 katalysiert. Eine vollständige Aktivierung der pPLC γ 2-Lipase ist dabei nur in Anwesenheit von pBTK möglich [135]. pPLC γ 2 beschleunigt wiederum die Hydrolyse von membranständigem PIP₂ in die Botenstoffe IP₃ (Inositoltriphosphat) und DAG (Diacylglycerin). Diese führen intrazellulär zu einer Aktivierung zahlreicher Signalwege und zur Transkription zahlreicher Gene.

IP₃ bindet intrazellulär an IP₃-Rezeptoren des endoplasmatischen Retikulums. Dadurch kommt es zu einer Ca²⁺-Freisetzung mit Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Spiegel. Aufgrund der in der Folge niedrigen Ca²⁺-Konzentration im endoplasmatischen Retikulum werden zusätzlich membranständige Ca²⁺-Kanäle geöffnet, welche die Ca²⁺-Konzentration weiter ansteigen lässt. In der Folge kommt es zur Komplexierung der Ca²⁺-Ionen mit Calmodulin, wodurch die Ca²⁺-abhängige Phosphatase Calcineurin bindet. Letztere führt über die Dephosphorylierung eines Kernlokalisierungssignals zur Aktivierung von NFAT-Transkriptionsfaktoren und damit zur Transkription von Zytokinen [146]. Darüber hinaus führen die hohen intrazellulären Ca²⁺-Spiegel und DAG zu einer Aktivierung der Proteinkinase C- β . Durch die Aktivierung des Ras-GEF führt die PKC- β zu einer Generierung von GTP-Ras und zur Einleitung des cRaf-MEK-ERK-Signalwegs. Dieser Signalweg reguliert unter anderem die Proliferation und Differenzierung der B-Zellen [138]. Durch eine Phosphorylierung von IKK β führt die PKC- β zudem zu einer Aktivierung des IKK-Komplexes mit

Einleitung des NF- κ B-Signalwegs, der die Proliferation der B-Zellen stimuliert und gleichzeitig die Apoptose hemmt [147]. Zuletzt führt die PKC- β auch zu einer Aktivierung der p38-MAPK [148], welche für die Transkription von Genen zur Zelldifferenzierung, des Zellwachstums und der Einleitung der Apoptose verantwortlich ist, sowie zu einer Aktivierung der JNK-1/2 [135], welche die Transkription proapoptotischer Gene stimuliert.

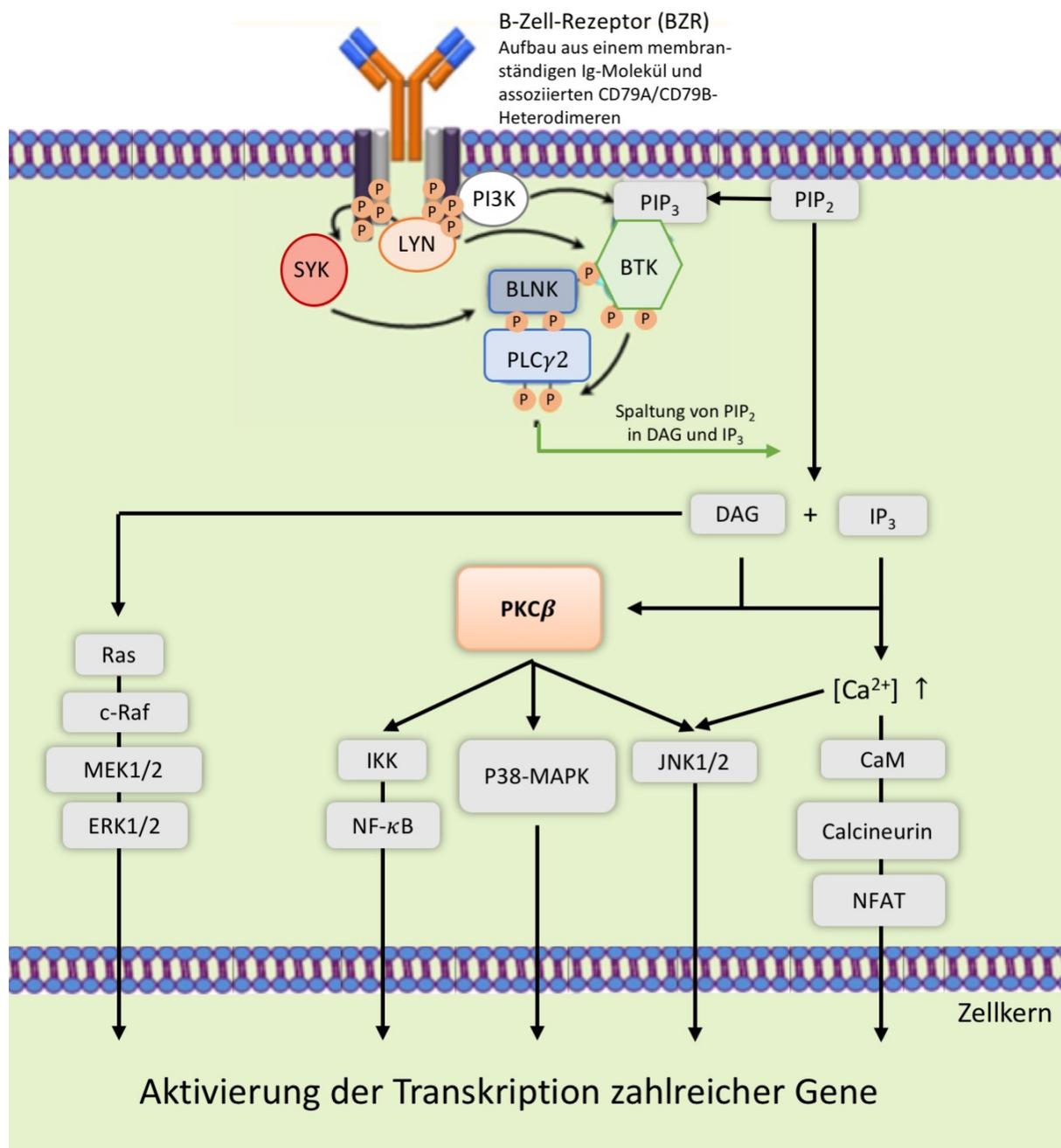


Abbildung 7: Schema des B-Zell-Rezeptor-Signalwegs.
 Erläuterungen im Text (modifiziert nach Mohammad et al., 2017 [149])

Aufgrund der entscheidenden Funktion des BZR-Signalwegs in der Reifung und Differenzierung der B-Zellen gibt es zahlreiche Regulationsmechanismen, die eine Überaktivität des Signalwegs unterdrücken. So kommt es zum Beispiel nach Aktivierung der PKC- β zu einer Phosphorylierung von BTK an Serin-180, wodurch sich Letzteres von PIP₃ löst und die weitere Signaltransduktion über den BZR gestoppt wird [149]. Zudem kann auch die Src-Kinase Lyn zur Limitierung der BZR-Signalweg-Aktivität über einen negativen Feedback-Mechanismus beitragen. Dazu phosphoryliert Lyn ITIM-Motive verschiedener Rezeptoren (z.B. CD22, CD5, CD72), wodurch es zu einer Aktivierung inhibitorischer Phosphatasen kommt. Diese führen über eine Dephosphorylierung der am BZR-Signalweg beteiligten Proteine zur Aufhebung der BZR-Signaltransduktion [150].

Zahlreiche der oben genannten, durch den BZR vermittelten Signalwege sind auch in CLL-Zellen aktiviert. Dem BZR-Signalweg kommt dabei eine entscheidende Rolle in der Entwicklung und Pathogenese von malignen B-Zell-Tumoren (unter anderem CLL) zu. Wie bereits gezeigt werden konnte, ist der BZR-Signalweg der am stärksten aktivierte Signalweg in CLL-Zellen [151]. Die Mechanismen, die dabei zu einer gestörten oder dauerhaften Aktivierung des BZRs führen, sind heterogen und noch nicht vollständig geklärt. Häufig kommt es durch die Dysregulation bzw. dauerhafte Aktivierung zu einer Stimulation der Proliferation und des Zellwachstums. So konnte beispielsweise in unbehandelten primären CLL-Zellen eine verstärkte Phosphorylierung von Lyn, Syk und ERK nachgewiesen werden [152] [153] [154]. Auch die Untereinheiten von NF- κ B waren bei den primären CLL-Zellen verstärkt phosphoryliert, was zusammenfassend auf eine verstärkte Aktivierung des BZR-Signalwegs mit Stimulation der Proliferation über NF- κ B hindeutet [155]. Hingegen sind die Signalwege über die p38-MAPK und JNK1/2 nur sehr schwach in CLL-Zellen aktiviert [156]. Zudem können CLL-Zellen Autoantigene produzieren, die nach Sekretion an den BZR binden und zu einer dauerhaften Stimulation der Zellen führen. Alternativ sind aber auch Antigen-unabhängige Mechanismen möglich, die zu einer verstärkten BZR-Signalweg-Aktivierung in CLL-Zellen führen [157]. Nur in seltenen Fällen kommt es bei der CLL zu Mutationen, die eine verstärkte Aktivierung des Signalwegs bewirken [158].

In den meisten Fällen handelt es sich beim Immunglobulin des BZRs von CLL-Zellen um IgM oder IgD. Vor allem BZR mit IgM sind dabei mit einer verstärkten Proliferation und einem gesteigerten Zellüberleben assoziiert [159]. Im Vergleich zu naiven B-Zellen werden die IgM der BZR jedoch vermindert exprimiert, was an einer

verminderten Rezeptor-Expression aufgrund einer dauerhaften Antigen-Bindung liegen könnte [160]. Zudem ist bei den BZR der CLL-Zellen auffällig, dass sie bei weitem keine so große Vielfalt wie naive B-Zellen vorweisen. In circa 30 % der CLL-Fälle zeigen sich ähnliche, sogenannte stereotype BZR. Die genaue Funktion dieser stereotypen BZR ist jedoch noch nicht vollständig geklärt [161]. Es existieren zahlreiche Proteine und Enzyme, welche die Aktivität des BZR in den B-Zellen beeinflussen. Dazu zählt unter anderem die physiologisch in T-Zellen exprimierte ZAP70-Tyrosinkinase, die zu einer Verstärkung des BZR-Signalwegs beitragen kann und mit einem aggressiveren Krankheitsverlauf assoziiert ist [162]. Darüber hinaus zeigen zahlreiche weitere Faktoren einen Einfluss auf den BZR-Signalweg, wie zum Beispiel PHLPP1, PKC- β , TCL1, CD79B, Lyn, uvm. [152] [157] [163] [164] [165]. Zudem zeigte sich in CLL-Zellen mit mehr als 2 % somatischen Hypermutationen im Gen der schweren Kette des Immunglobulins des BZR (IGHV) eine schwächere Aktivierung des BZR-Signalwegs als in unmutierten CLL-Zellen [158]. IGHV-mutierte CLL-Zellen sind mit einer besseren Prognose des Patienten assoziiert.

3 Materialien

3.1 Chemikalien

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien

	Artikelnummer	Hersteller
2-Propanol (Isopropanol)	6752.3	Carl Roth
Ammoniumsulfat	A3678	Sigma-Aldrich
Bovines Serum Albumin (BSA)	8076.1	Carl Roth
Chloroform	3313.4	Carl Roth
Dimethylsulfoxid	A994.2	Carl Roth
Dulbecco's Phosphat buffered Saline (PBS)	D8537	Sigma-Aldrich
Ethanol	32205	Sigma-Aldrich
Ethanol, vergällt	K928.3	Carl Roth
Histopaque®-1077	10771	Sigma-Aldrich
Formaldehyd	F8775	Sigma-Aldrich
Glycin	3908.2	Carl Roth
L-Arginin	A-8094	Sigma-Aldrich
L-Leucin	61819	Sigma-Aldrich
L-Lysin	L-5626	Sigma-Aldrich
Methanol	0082.3	Carl Roth
Milchpulver	T145.1	Carl Roth
Natriumchlorid	3957.1	Carl Roth
Natriumdodecylsulfat	L3771	Sigma-Aldrich
ODN-2006	tIrl-2006	Invivo Gen
Qiazol Lysis Reagent	79306	QIAGEN Science
RNAse-freies Wasser	AM9932	Ambion™
Rotiphorese®Gel 30	3029.1	Carl Roth
Rotiszint® eco plus	0016.3	Carl Roth
<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin (TEMED)	T9281	Sigma-Aldrich
[³ H]-Thymidin	NET027	Perkin Elmer
Tris	4855.2	Carl Roth
Trypanblau	T-0776	Biochrom AG
Tween® 20	9127.1	Carl Roth
β -Mercaptoethanol	4227.3	Carl Roth

3.2 Medien und Medienzusätze

Tabelle 3: Verwendete Medien und Medienzusätze

Medium	Artikelnummer	Hersteller
Fötale Kälberserum (FCS) dialysiert, hitzeinaktiviert	F0392	Sigma-Aldrich
Fötale Kälberserum (FCS), hitzeinaktiviert	F7524	Sigma-Aldrich
L-Arginin	A-8094	Sigma-Aldrich
L-Glutamin	G7513	Sigma-Aldrich
L- Leucin	61819	Sigma-Aldrich
L-Lysin Monohydrochlorid	L8662	Sigma-Aldrich
Penicillin-Streptomycin-Lösung	P4333	Sigma-Aldrich
IMDM-Medium	I3390	Sigma-Aldrich
RPMI-1640-Medium mit Natriumhydrogencarbonat, ohne L-Glutamin, steril filtriert	R0883	Sigma-Aldrich
Ziegenserum (Goat serum, sterile frozen)	CL1200-500	Cedarlane

3.3 Lösungen und Puffer

Alle Chemikalien zum Ansetzen der Lösungen und Puffer wurden, wenn nicht anders beschrieben, von Sigma Aldrich oder Carl Roth bezogen.

Tabelle 4: Verwendete Lösungen und Puffer

Lösung / Puffer	Zusammensetzung
4 % Trypanblau-Lösung	0,1 % Trypanblau in 1x PBS
1 % PFA	1 % Paraformaldehyd in 1x PBS
2 x Taq-Puffer	40 mM Tris/HCl, pH = 8,7 20 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 8 mM MgCl ₂ 20 mM KCl
2 x Sample-Buffer (2-fach Probenpuffer)	125 mM Tris 20 % Glycerol 5 % SDS 8 M Urea 0,001 % Bromphenolblau 2 % β-Mercaptoethanol Ad 50 ml dH ₂ O, pH = 6,8
10 % SDS-Lösung	10 % SDS Ad dH ₂ O, pH = 7,2

10 x SDS-Laufpuffer	250 mM Tris 1,9 M Glycin 1 % SDS
10 x PBS	17,6 mM KH ₂ PO ₄ 26,8 mM KCl 1,4 M NaCl 101 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O pH = 7,4
10 x TBS	100 mM Tris/HCl, pH = 8 1,5 M NaCl
Allgemeiner Antikörper-Verdünnungspuffer	1 % BSA 0,1 % Tween® 20 Ad 1 x PBS, pH = 7,4
Spezifischer Antikörper-Verdünnungspuffer	5 % BSA in 1 x TBST
Elektroblotting-Puffer WB	20 mM Tris 150 mM Glycin 20 % Methanol
Blotto-Puffer WB	5 % Milchpulver 50 mM Tris/HCl (50 mM), pH = 8 2 mM CaCl ₂ (2 mM) 0,05 % Tween® 20 0,01 % Antifoam
Erythrozyten-Lysepuffer	0,15 M NH ₄ Cl 1 mM KHCO ₃ 0,1 mM Na ₂ EDTA Ad 500 ml dH ₂ O, pH = 7,3
Radio Immunoprecipitation-Puffer (RIPA-Puffer)	150 mM NaCl 1 mM EDTA 100 mM Tris/HCl, pH = 8 1 % Triton-X-100 0,5 % Natriumdeoxycholat 1 % SDS
Sammelgel-Puffer	0,5 M Tris/HCl, pH = 6,8 0,4 % SDS
Stripping-Puffer	2 % SDS 100 mM β-Mercaptoethanol 50 mM Tris/HCl, pH = 6,8 Ad 100 ml H ₂ O
TBST	0,1 % Tween® 20 in 1 x TBS
Trenngel-Puffer	1,5 M Tris/HCl, pH = 8,8 0,4 % SDS

3.4 Kits

Tabelle 5: Verwendete Kits

Kit	Bestandteile	Artikelnummer	Hersteller
BD Pharmingen™ FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I	10 x Annexin V Binding Buffer FITC Annexin V Propidiumiodid Staining Solution	556547	BD Biosciences
CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent		G3581	Promega
DC™ Protein Assay Reagents Package	DC™ Protein Assay Reagent A DC™ Protein Assay Reagent B DC™ Protein Assay Reagent S	5000116	Bio-Rad
Western Lightning® Plus ECL	Oxidizing Reagent Plus Enhanced Luminol Reagent Plus	NEL 103001EA	Perkin Elmer
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	10 x RT-Puffer 25 x dNTPs Mix 10 x RT Random Primer Multi Scribe Reverse Transkriptase	4368813	Applied Biosystems™
Taq DNA Polymerase with ThermoPol® Buffer	Taq DNA Polymerase ThermoPol Buffer	M0267S	New England BioLabs

3.5 Geräte

Tabelle 6: Verwendete Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Abzug	2-453-GAHD	Köttermann
Blottingkammer	Trans-Blot® Cell	Bio-Rad
Durchflusszytometer	BD FACS Canto II	BD Biosciences
Energieversorgung SDS	Power PAC™ 3000	Bio-Rad
Energieversorgung WB	Power PAC™ HC	Bio-Rad
Gelkammer SDS	Mini-PROTEAN® Tetra System	Bio-Rad
Heizblock	Thermostat Plus 1,5 ml	Eppendorf
Inkubator	Function Line	Heraeus
Mikroskop	AE2000	Motic
Mikrovolumen-Spektrophotometer	NanoDrop™ One	Thermo Fisher Scientific
PCR-Gerät	GeneTouch TC-EA	BIOER
Platereader	MRXc	DYNEX Technologies
Sterilbank	Hera Safe HS18	Heraeus
Vortexer	REAX 2000	Heidolph
	Vortex Genius 3	IKA Labortechnik
	G-560 E	Scientific Industries
Wasserbad	1003	GFL
Zentrifuge groß	Heraeus Megafuge 40R	Thermo Fisher Scientific
Zentrifuge klein	Centrifuge 5417R	Eppendorf
Zentrifuge klein	Heraeus Biofuge Fresco	Thermo Fisher Scientific

3.6 Zelllinien

Tabelle 7: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Hersteller
FD50 NL1	Multiples Myelom	Neu etablierte Zelllinie aus Knochenmark eines Patienten mit primärer Plasmazelleukämie (Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. Markus Munder, III. Med. Klinik Universitätsmedizin Mainz)
HG3	Chronische Lymphatische Leukämie	Anders Rosén (Linköping Universität, Linköping, Schweden)
JVM-2	Chronische Lymphatische Leukämie	Thorsten Zenz (Nationales Centrum für Tumorerkrankungen, Heidelberg)
MEC1	Chronische Lymphatische Leukämie	Thorsten Zenz (Nationales Centrum für Tumorerkrankungen, Heidelberg)
NCI H929	Multiples Myelom	Prof. Dr. med. Michael Hundemer (Hämatologie, Onkologie, Rheumatologie, Universitätsklinikum Heidelberg)

Die NCI-H929 wurden in der AG Theobald mit humanem HLA-A2 transfiziert. Im Folgenden werden die NCI H929 HLA-A2-Zellen NCI-A2 genannt und die FD50 NL1 werden mit FD50 abgekürzt.

3.7 Inhibitoren

Tabelle 8: Verwendete Inhibitoren

Inhibitor	Artikelnummer	Hersteller
Akt-Inhibitor (Akti-1/2)	5773	TOCRIS bioscience
BTK-Inhibitor (Ibrutinib)	HY-10997	MedChemExpress
NF- κ B-Inhibitor (Bay 11-7082)	B5556	Sigma-Aldrich

Die verwendeten Inhibitoren (Akt-Inhibitor, BTK-Inhibitor, NF- κ B-Inhibitor) wurden jeweils in DMSO gelöst. Der Akt- und BTK-Inhibitor wurden dabei in einer 5 mM-Stocklösung angesetzt, während der NF- κ B-Inhibitor in einer 1 mM-Stocklösung angesetzt wurde.

3.8 Antikörper

3.8.1 Primärantikörper

Tabelle 9: Verwendete Primärantikörper

Primärantikörper	Ursprung	Hersteller	Verdünnung
Akt pan	Kaninchen	Cell Signaling (4865S)	1:1000 in spezifischem Antikörperverdünnungspuffer
GAPDH	Kaninchen	Cell Signaling (2118L)	1:10000 in Blotto-Puffer
CAT-1	Kaninchen	Institut für Pharmakologie, Universitätsmedizin Mainz	1:10000 in allgemeinem Antikörperverdünnungspuffer
p-Akt (Ser473)	Kaninchen	Cell Signaling (4060S)	1:1000 in spezifischem Antikörperverdünnungspuffer
p-Akt (Thr308)	Kaninchen	Cell Signaling (13038S)	1:1000 in spezifischem Antikörperverdünnungspuffer
p-I κ B α	Kaninchen	Cell Signaling (2859S)	1:1000 in spezifischem Antikörperverdünnungspuffer
p-PLC γ 2	Kaninchen	Cell Signaling (55512S)	1:1000 in spezifischem Antikörperverdünnungspuffer
IgG1 κ	Maus	BD Pharmingen™ (555749)	
IgG1 κ -CD3	Maus	BD Pharmingen™ (555333)	
IgG1 κ -CD5	Maus	BD Pharmingen™ (555353)	
IgG1 κ -CD19	Maus	BD Pharmingen™ (555413)	

3.8.2 Sekundärantikörper

Tabelle 10: Verwendete Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Verdünnung	Verdünnungspuffer	Artikel- nummer	Hersteller
Anti-Kaninchen IgG, Peroxidase gekoppelt	1:5000	Spezifischer Antikörper- Verdünnungspuffer	7074S	Cell Signaling

3.9 Weitere Materialien für den Western Blot

Tabelle 11: Weitere Materialien für den Western Blot

	Artikelnummer	Hersteller
Entwickler (HC-110)	10002556	Kodak Professional
Fixierer (ADOFIX Plus)	43246	ADOX Fotowerke GmbH
N-Glykosidase F	11365193001	Roche
Nitrocellulosemembran (Protran™)	NBA083C001EA	Perkin Elmer
Phosphatase-Inhibitor (PhosSTOP™ Easypack)	04906837001	Roche
Proteinase-Inhibitor (cOmplete Mini)	11836153001	Roche
Precision Plus Protein Western C Standards	1610376	Bio-Rad
Whatman-Papier (Cellulose chromatography papers Grade 3MM Chr, Whatman)	514-8013	VWR

4 Methoden

4.1 Methoden der Zellkultur

4.1.1 Kultivierung der Zellen

Im Rahmen meiner Doktorarbeit habe ich mit fünf Zelllinien (Tabelle 7) gearbeitet. Dabei handelte es sich sowohl um CLL- (HG3, JVM-2, MEC1) als auch um Myelom-Zelllinien (FD50, NCI-A2). Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte in Suspensionszellkulturflaschen mit Filterschraubverschluss. Abgesehen von der MEC1-Zelllinie (Kultivierung in IMDM-Vollmedium) wurde ein RPMI-1640-Vollmedium zur Kultivierung der Zellen verwendet. Die Zusammensetzung der verwendeten Vollmedien ist Tabelle 12 zu entnehmen.

Tabelle 12: Zusammensetzung der genutzten Zellkulturmedien

Medium	Zusammensetzung
RPMI-Vollmedium	RPMI-1640 Medium 10 % FBS (hitzeinaktiviert) 2 mM Glutamin 10 U/ml Penicillin 0,1 mg/ml Streptomycin
IMDM-Vollmedium	IMDM-Medium 10 % FBS (hitzeinaktiviert) 2 mM Glutamin 10 U/ml Penicillin 0,1 mg/ml Streptomycin

Die Inkubation der Zellen erfolgte konstant bei 37 °C und einem CO₂-Gehalt von 5 % in einem Inkubator. Alle verwendeten Kulturmedien, Lösungen und Chemikalien wurden vor der Arbeit mit den Zelllinien in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Die Arbeit mit den Zelllinien erfolgte stets unter einer Sterilbank, um eine mögliche Kontamination zu vermeiden.

Bedingt durch ein kontinuierliches Zellwachstum mussten die Zellen zweimal wöchentlich passagiert bzw. gesplittet werden. Der Verdünnungsgrad der Zellen im RPMI-Vollmedium (bzw. IMDM-Vollmedium bei der MEC1-Zelllinie) war dabei von der Zelllinie abhängig. Während die HG3- und NCI-A2-Zelllinien regelmäßig im Verhältnis 1:10 verdünnt wurden, war bei den übrigen Zelllinien eine geringere Verdünnung erforderlich (FD50 = 1:5, JVM-2 = 1:5, MEC1 = 1:7).

Am Tag vor Versuchsstart wurde jeweils ein Mediumwechsel durchgeführt. Dafür wurden die Zellen bei 1500 rpm (Heraeus Megafuge 40R) für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand verworfen und das Zell-Pellet in 20 ml frisches RPMI-Vollmedium aufgenommen.

4.1.2 Kryokonservierung der Zellen

Um Zellen oder organisches Gewebe über einen längeren Zeitraum aufbewahren zu können, wurden diese in flüssigem Stickstoff eingefroren (Kryokonservierung).

Die Kryokonservierung erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurden die Zellen einer Zelllinie in FBS, welches mit 10%igem DMSO supplementiert wurde, gelöst und auf mehrere 1,5 ml-Kryoröhrchen aliquotiert. Im Anschluss wurden die Zellen zunächst bei -80 °C eingefroren, bevor sie in flüssigem Stickstoff bei einer Temperatur von -196 °C gelagert wurden. Durch das schrittweise Einfrieren der Zellen wurde der Bildung von intrazellulären Eiskristallen entgegengewirkt, die zu Zellschäden und einer geringeren Überlebensrate führen.

4.1.3 Bestimmung der Zellzahl lebender Zellen

Vor dem Versuchsbeginn wurden die Viabilität und die Zellzahl der Zelllinien mikroskopisch durch Trypanblau-Färbung festgestellt. Dafür wurden 50 μ l einer Zellsuspension mit 50 μ l Trypan-Blau vermischt. Trypan-Blau-Lösung gelangt lediglich durch die poröse Zellmembran toter Zellen und lässt diese blau erscheinen. Die gefärbten Zellen wurden in eine Neubauer-Zählkammer übertragen. Eine Neubauer-Zählkammer ist in vier Quadranten aufgeteilt, die jeweils aus 16 einzelnen Quadranten bestehen. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die lebenden Zellen in zwei gegenüberliegenden 4 x 4-Quadranten gezählt. Durch eine Multiplikation der Zellzahl viabler Zellen mit dem Faktor 10000 (Kammerkonstante gemäß Herstellerangaben) konnte dadurch die Zellzahl pro Milliliter berechnet werden.

4.2 Kultivierung von primären und immortalisierten CLL-Zellen in der Gegenwart von Signalweg-Inhibitoren

4.2.1 Ansetzen der Versuchsbedingungen mit HG3-Zellen

In allen durchgeführten Versuchen wurden 7×10^5 Zellen / ml RPMI-Vollmedium eingesetzt. Die benötigte Zellzahl wurde in 50 ml-Reaktionsgefäße überführt und bei

1500 rpm (Heraeus Megafuge 40R) für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand verworfen und die Zellen in neuem Medium aufgenommen. Die Versuchsbedingungen variierten in den zu untersuchenden Zeitpunkten (6 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h) sowie in den Inhibitor-Konzentrationen. Da die Inhibitoren in DMSO gelöst vorlagen (Tabelle 8), wurde zudem jeweils eine DMSO-Kontrolle entsprechend der DMSO-Konzentration der höchsten Inhibitor-Konzentration hinzugefügt. Dadurch sollte ein potentiell zelltoxischer Effekt des DMSO ausgeschlossen werden. Die Zellen wurden für die Versuche in 6- und 24-Lochplatten inkubiert. Für die Analyse der Protein- und RNA-Expression wurden 2×10^6 Zellen pro Bedingung eingesetzt. Hingegen wurden für die Analyse der Viabilität der Zellen lediglich 7×10^5 Zellen verwendet.

Für die Überprüfung der CAT-1-Expression in Abhängigkeit von Arginin wurden HG3-Zellen in einem Argininmangelmedium (Tabelle 13) inkubiert.

Tabelle 13: Zusammensetzung des Argininmangelmediums

Ansetzen des Argininmangelmediums (50 ml)

Dialysiertes FCS	10 % (5 ml)
Leucin (100 mM)	0,4 % (200 μ l)
Lysin (100 mM)	0,22 % (110 μ l)
Glutamin	1 % (500 μ l)
Penicillin + Streptomycin	1 % (500 μ l)
RPMI-1640-Mangelmedium	Auffüllen auf 50 ml Steril filtrieren

Vor der Aufnahme der HG3-Zellen in Argininmangelmedium wurden die Zellen dreimal mit Argininmangelmedium gewaschen, um potentiell vorhandenes Arginin auszuwaschen.

4.2.2 Ansetzen der Versuchsbedingungen aus den primären CLL-Zellen

4.2.2.1 Aufbereitung von tiefgefrorenen CLL-Patienten-Blutproben

Für die Arbeit mit kryokonservierten CLL-Patientenproben (PBMC-Zellpellets aus hochleukämischen CLL-Patienten) wurden diese nach dem Auftauen durch die Aufnahme in 8,5 ml vorgewärmtes RPMI-Medium und anschließender Zentrifugation (1500 rpm, 5 min, 20 °C, Heraeus Megafuge 40R) vom DMSO befreit. Das Zell-Pellet

wurde in 3 ml RPMI-Medium resuspendiert, in eine 6-Lochplatte überführt und für eine Stunde bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt.

4.2.2.2 Isolation primärer CLL-Zellen

Humane primäre CLL-Zellen wurden über Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation aus peripherem Vollblut von CLL-Patienten isoliert. Dafür wurden die Blutproben vorsichtig in 50 ml-Reaktionsgefäße überführt, im Verhältnis 1:1 mit 1 x PBS + 2 mM EDTA verdünnt und bei 2500 rpm für 15 Minuten bei Raumtemperatur (ACC = 6, DEC = 0, Heraeus Megafuge 40R) zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die PBMC-Fraktion vorsichtig entnommen. Die CLL-Zellen wurde anschließend zweimal mit 1 x PBS + 2 mM EDTA gewaschen. Zuletzt wurde das Zellpellet in 1 x PBS + 2 mM EDTA aufgenommen und die Zellzahl wurde bestimmt.

Gegebenenfalls wurden Erythrozyten durch die Zugabe von 15 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer und einer anschließenden Inkubation für 15 Minuten auf Eis entfernt.

4.2.2.3 Ansetzen der Versuchsbedingungen

Nach der Isolation der B-Zellen wurden diese mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer im Mikroskop gezählt. Für den Versuchsansatz wurde die gewünschte Zellmenge zentrifugiert (1500 rpm, 5 min, Raumtemperatur, Heraeus Megafuge 40R), der Überstand verworfen und die Zellen in RPMI-Vollmedium resuspendiert. Die resuspendierten Zellen wurden daraufhin auf eine Lochplatte verteilt.

Für Proteinexpressionsstudien wurden pro Versuchsbedingung 8×10^6 Zellen in 1,2 ml RPMI-Medium inkubiert. Zur Viabilitätsprüfung und zur Proliferationsanalyse mit Hilfe des Thymidin-Assays wurden 1×10^6 Zellen pro 200 μ l RPMI-Medium eingesetzt.

4.2.2.4 Stimulation primärer CLL-Zellen

Die Stimulation der CLL-Zellen erfolgte über den Toll-like-Rezeptor 9 durch die Hinzugabe eines TLR9-Agonisten (ODN-2006, Invivo Gen). Dabei wurden jeweils 7,5 μ g/ml des TLR9-Agonisten ODN-2006 eingesetzt.

4.3 Durchflusszytometrie (FACS)

4.3.1 Funktionsprinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie bietet ein breites Spektrum an verschiedenen Anwendungsmöglichkeiten. Dabei werden die Zellen nacheinander durch einen kleinen Kanal einer sehr präzisen Küvette gezogen und mit einem Laser bestrahlt, wodurch sie optische Signale emittieren. Das Streulicht kann dabei mit Hilfe zahlreicher Detektoren registriert werden und erlaubt Rückschlüsse auf die Größe und Form der Zellen. Das Vorwärtsstreulicht (FSC) ist dabei ein Maß für die Beugung des Lichts und charakteristisch für das Volumen bzw. die Größe der Zellen. Das Seitwärtsstreulicht (SSC) ist wiederum ein Maß für die Brechung des Lichts und abhängig von der Struktur der Zellen (z.B. Granularität, Struktur des Zellkerns, Vorkommen von intrazellulären Vesikeln, etc.).

Zudem lassen sich zelluläre Oberflächenproteine mit Hilfe von Reagenzien oder an Antikörper gebundener fluoreszierender Farbstoffe markieren und deren Anteil mit Hilfe bestimmter Laser des Durchflusszytometers bestimmen. Zur Detektion frühapoptotischer Zellen wurde der Fluoreszenzfarbstoff FITC (Fluoresceinisothiocyanat) verwendet, der an Annexin V gekoppelt wurde. Der Nachweis toter Zellen erfolgte durch die fluoreszierende Wirkung von Propidiumiodid, welches im PE-Kanal (Phycoerythrin) des Durchflusszytometers registriert werden konnte.

4.3.2 Probenvorbereitung für die FACS-Messung

Die Zell-Viabilität wurde mittels der durchflusszytometrischen Quantifizierung PI- und Annexin-V-positiver Zellen festgestellt (BD Pharmingen™ FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I). Dafür wurden 1×10^6 Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt und mit 1 ml PBS gewaschen.

Für die Färbung mit Annexin V wurden die Zellen in 200 μ l Annexin-Bindepuffer resuspendiert. Anschließend wurden 4 μ l Annexin V hinzugegeben und die Zellen für 15 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert. Annexin V stellt einen Marker für die frühe Apoptose dar, indem es an Phosphatidylserin-Reste in der Zellmembran bindet, die sich bei vitalen Zellen im Inneren der Zelle befinden und erst im Zuge der frühen Apoptose an die Zelloberfläche gelangen. Nach der 15-minütigen Inkubation wurden die Zellen nach Hinzugabe von 1 ml Annexin-Bindepuffer erneut zentrifugiert.

Der Überstand wurde daraufhin verworfen und die Zellen in 500 μ l Annexin-Bindepuffer resuspendiert.

Für die Färbung mit Propidiumiodid wurden die Zellen in 500 μ l PBS resuspendiert. Anschließend wurden 5 μ l Propidiumiodid hinzugeben. Propidiumiodid kann ausschließlich die poröse Membran toter Zellen überwinden. Als Kontrolle wurden auch nicht gefärbte Zellen analysiert.

4.3.3 Immunphänotypisierung (Reinheitskontrolle)

Nach Isolation der primären CLL-Zellen aus den Blutproben verschiedener Patienten erfolgte eine Reinheitskontrolle mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Dabei wurden verschiedene B-Zell-/CLL-Zell-spezifische (CD5, CD19) und T-Zell-spezifische (CD3) Oberflächenmarker überprüft.

Dafür wurden zunächst 1×10^6 Zellen mit $1 \times$ PBS + 2 mM EDTA gewaschen. Anschließend erfolgte die Färbung durch Zugabe von 3 μ l des jeweiligen Antikörpers (IgG1 κ -CD5 (PE), IgG1 κ -CD19 (PE), IgG1 κ -CD3 (PE), oder IgG1 κ (PE) als Isotypkontrolle, Tabelle 9). Nach einer lichtgeschützten Inkubation für 15 Minuten wurden die Zellen gewaschen und anschließend in 300 μ l $1 \times$ PFA + 2 mM EDTA-Puffer fixiert. Es erfolgte eine lichtgeschützte Lagerung bei 4 °C über Nacht, bevor die Messung am Durchflusszytometer erfolgte. Als Kontrolle wurden ebenfalls ungefärbte Zellen analysiert.

Das CD3-Antigen befindet sich auf der Oberfläche von T-Lymphozyten und ist an der Aktivierung von T-Lymphozyten über den T-Zell-Rezeptor beteiligt. Immunhistochemisch dient es der Färbung von T-Lymphozyten, da es ausschließlich auf der Oberfläche von T-Lymphozyten exprimiert wird [166]. Das CD5-Antigen wird ebenfalls auf der Oberfläche von T-Lymphozyten jedoch auch auf einigen B-Lymphozyten exprimiert. CD5 wirkt dabei als ein Inhibitor der Signaltransduktion (unter anderem über Cbl) [167]. Beim CD19-Antigen handelt es sich um ein Transmembranprotein, das ausschließlich in der Zellmembran von B-Lymphozyten exprimiert wird [166]. Charakteristisch für CLL-Zellen ist die starke Koexpression der Differenzierungsantigene CD5 und CD19, während das CD3-Antigen auf der Oberfläche von CLL-Zellen nicht exprimiert wird [168].

4.4 Proteinbiochemische Methoden

4.4.1 Isolation von Proteinen

Zur Isolation der Proteine wurden die Zellen zunächst mit 1 ml 1 x PBS gewaschen. Anschließend wurde das Zell-Pellet in 150 μ l RIPA-Puffer (Tabelle 4) aufgenommen, welcher zuvor mit Phosphatase- und Proteinase-Inhibitoren supplementiert wurde. Die Zell-Lyse geschah durch 10-sekündiges Zentrifugieren in einem Intervall von 10 Minuten über insgesamt 30 Minuten unter ständiger Eiskühlung.

Daraufhin wurde die Protein-Lösung bei 13000 rpm (Centrifuge 5417R) für 15 Minuten in einer auf 4 °C vorgekühlten Zentrifuge zentrifugiert. Dieser Schritt diente der Abzentrifugation der Zelltrümmer. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand in neue 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und der Rest verworfen.

4.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Lowry

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte nach Lowry mit dem DC™ Protein Assay Kit von Bio-Rad. Der Methode nach Lowry liegt eine kolorimetrische Messung zugrunde. Die Methode basiert auf der Reduktion des zuvor hinzugegeben Kupfer-(II)-tartrat (Stammlösung B) durch die Tyrosin- und Tryptophanreste der lysierten Proteine in einem alkalischen Milieu. Es kommt zur Ausbildung eines Kupfer-Protein-Komplexes (mit Kupfer-(I)-Ionen), wodurch das ebenfalls hinzugefügte Folin-Reagenz zu Molybdänblau (Absorptionsmaximum bei 690 nm) reduziert wird. Dadurch entsteht die charakteristische blaue Farbe. Je höher die Proteinkonzentration in einer Probe ist, desto intensiver erscheint die blaue Farbe.

Bei der Proteinkonzentrationsbestimmung nach Lowry handelt es sich um eine relative Bestimmung der Proteinkonzentration. Durch den Vergleich mit einer Standardkonzentrationsreihe mit bekannter Konzentration von Bovinem Serum Albumin (BSA) kann die Proteinkonzentration der Testlösung berechnet werden. Zum Erstellen der Standardkonzentrationsreihe wird die BSA-Lösung (Konzentration = 4000 μ g/ml) mehrfach im Verhältnis 1:1 mit RIPA-Puffer (inklusive Phosphatase- und Proteinase-Inhibitor) verdünnt. Dadurch entsteht eine Eichgerade mit folgenden Konzentrationen: 4000 μ g/ml, 2000 μ g/ml, 1000 μ g/ml, 500 μ g/ml, 250 μ g/ml, 125 μ g/ml, 62,5 μ g/ml und 0 μ g/ml. Die weitere Vorbereitung der Proteinbestimmung erfolgte mit dem DC™ Protein Assay Kit von Bio-Rad gemäß den Anweisungen des Herstellers. Im Anschluss erfolgte die kolorimetrische Messung der Konzentrationen bei einer Wellenlänge von 690 nm im Plate reader.

4.4.3 Glykosidase-Behandlung

Durch Glykosylierungen des CAT-1 erscheint die CAT-1-Bande nach SDS-PAGE im Western Blot unklar in einem Bereich zwischen 55 und 90 kDa. Aus diesem Grund wird vor dem Start der Gelelektrophorese eine Glykosidase-Behandlung durchgeführt, um die Zuckerreste abzuspalten und eine klare Bande im Western Blot zu erhalten. Dazu wurden zu 50 µg Protein 1 U Glykosidase (N-Glykosidase F, Roche) gegeben und die Proteine im Anschluss bei 37 °C für 45 Minuten inkubiert.

4.4.4 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)

Eine SDS-PAGE dient der Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe in einem elektrischen Feld. Durch die unterschiedlich großen Poren im Polyacrylamidgel können vor allem kleinere Proteine schneller im elektrischen Feld wandern als größere.

Für die SDS-PAGE wurden jeweils 50 µg Protein eingesetzt und im Verhältnis 1:1 mit Probenpuffer vermischt (2 x Sample-Buffer, Tabelle 4). Der Probenpuffer enthält Sodiumdodecylsulfat (SDS), welches zur Denaturierung und negativen Ladung der Proteine führt, sodass die Auftrennung nach Größe und ladungsunabhängig erfolgt. Zusätzlich kommt es durch das hinzugefügte β-Mercaptoethanol zur Spaltung von Disulfidbrücken innerhalb der Proteine. Die Proben wurden bei 37 °C für 15 Minuten denaturiert.

Für die Gelelektrophorese wurde ein 12%iges Polyacrylamidgel verwendet. Dazu wurden Trenn- und Sammelgel in unten aufgelistetem Verhältnis gegossen.

Tabelle 14: Zusammensetzung eines 12%igen Polyacrylamidgels

Trenngel (50 ml)	Sammelgel (10 ml)
17,5 ml H ₂ O	6,1 ml H ₂ O
12,5 ml von 1,5 M Tris/HCl (pH = 8,8) inkl. 0,4 % SDS	2,5 ml von 0,5 M Tris/HCl (pH = 6,8) inkl. 0,4 % SDS
20 ml Rotiphorese®Gel 30	1,3 ml Rotiphorese®Gel 30
500 µl APS	50 µl APS
35 µl TEMED	10 µl TEMED

Durch die Zugabe von APS (Ammoniumpersulfat) und TEMED (Tetramethylethyldiamin) kam es zur Auspolymerisierung des Polyacrylamidgels. Das Gel wurde in eine mit 1 x SDS-Running-Puffer (Tabelle 4) gefüllte Elektroblootting-Kammer eingebracht. Im Anschluss wurden die Proteinproben in die verbliebenen Taschen aufgetragen. Zusätzlich wurden 15 μ l des Proteinstandards Precision Plus Protein Western C Standard in eine Tasche pipettiert. Schließlich wurden die Proben durch das Anlegen einer Spannung (120 V) aufgetrennt.

4.4.5 Western Blot

Durch einen Western Blot werden die nach ihrer Größe aufgetrennten Proteine in einem elektrischen Feld aus dem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dafür wurde das Polyacrylamidgel unmittelbar nach dem Beenden der SDS-PAGE auf eine Nitrocellulose-Membran gelegt und von mehreren Schichten Whatman-Papier und Schwämmen in einem Western Blot-Gitter umgeben. Dieses Gitter wurde in die Western Blot-Kammer geschoben, die zuvor mit Blotting-Puffer (Tabelle 4) aufgefüllt wurde. Der Proteintransfer geschah über Nacht bei einer Stromstärke von 200 mA und einer Temperatur von 4 °C.

Am nächsten Morgen wurde die Nitrocellulose-Membran entnommen und mit Ponceau S gefärbt. Dadurch wurden die Proteinbanden sichtbar und der Erfolg des Proteintransfers konnte überprüft werden. Im Anschluss wurde die Nitrocellulose-Membran dreimal für zehn Minuten mit Blotto-Puffer gewaschen, um das Ponceau S zu entfernen. Anschließend wurden freie Endigungen auf der Membran durch die Inkubation in Blotto-Puffer, welcher mit 500 μ l Ziegen Serum supplementiert wurde, für eine Stunde blockiert. Danach wurde die Membran dreimal für zehn Minuten mit allgemeinem Antikörper-Verdünnungspuffer gewaschen, bevor die Primärantikörper aufgetragen wurden.

Die Primärantikörper wurden, wie in Tabelle 15 aufgeführt, angesetzt:

Tabelle 15: Ansetzen der Primärantikörper

	Medium	Verhältnis
CAT-1	allgemeiner Antikörper-Verdünnungspuffer	1:10000
GAPDH	Blotto-Puffer	1:10000
Restliche Primärantikörper (Akt pan, p-Akt (Ser473), p-Akt (Thr308), p-I κ B α und p-PLC γ 2)	Spezifischer Antikörper-Verdünnungspuffer	1:1000

Nach dem Auftragen der Primärantikörper wurde die Membran über Nacht auf einem Schüttler bei 4 °C inkubiert.

Am folgenden Tag wurden die angesetzten Primärantikörper-Lösungen verworfen und die Membranen dreimal für 10 Minuten mit Blotto-Puffer gewaschen. Im Anschluss erfolgte das Auftragen des Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers (Tabelle 10). Die Membranen wurden für 1 Stunde auf einem Schüttler inkubiert, um die Bindung des Sekundärantikörpers an den Primärantikörper zu gewährleisten. Anschließend wurde der Sekundärantikörper verworfen und die Membran dreimal für zehn Minuten mit TBST (Tabelle 4) und zuletzt noch einmal mit TBS (Tabelle 4) gewaschen. Danach wurden die Membranen mit einem ECL-Reagenz (Western Lightning ® Plus ECL, Perkin Elmer) benetzt, wodurch die nachzuweisenden Proteine auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden können. Im ECL-Reagenz enthaltenes Luminol wird von den Peroxidasen der Sekundärantikörper unter Abgabe von Wasserstoffperoxid oxidiert. Die freigesetzte Energie wird in Form von Licht der Wellenlänge 425 nm abgegeben. Dies kann mit einem Röntgenfilm nachgewiesen werden. Die benötigte Belichtungszeit variierte nach Proteinmenge und -größe sowie der Qualität des eingesetzten Primärantikörpers.

4.4.6 Strippen der Membranen

Wenn mehrere Proteine mit ähnlichem Molekulargewicht untersucht werden sollten, wurde der Primärantikörper durch einen sogenannten Stripping-Puffer (Tabelle 4) von der Membran entfernt. Die Membranen wurden dazu in Stripping-Puffer für 30 Minuten im Wasserbad bei 50 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Membranen mehrmals für 5 Minuten mit PBS gewaschen.

4.5 RNA-Analyse

4.5.1 Isolation der RNA

Um RNA aus Zellen zu isolieren, wurden diese zunächst bei 1500 rpm (Heraeus Megafuge 40R) für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde durch Wegkippen verworfen und das Zell-Pellet in 1 ml PBS aufgenommen, in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und bei 1800 rpm (Centrifuge 5417R) für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Zell-Pellet wurde in 1 ml Qiazol resuspendiert.

Zusätzlich wurden 200 μl Chloroform zu der RNA-Lösung gegeben. Durch 10-sekündiges Vortexen wurde das Chloroform vollständig mit dem Qiazol gemischt. Im Anschluss wurde die RNA-Lösung für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, wodurch sich eine helle, obere Phase und eine violette, untere Phase entwickelten. Daraufhin wurden die Zellen bei 13000 rpm (Centrifuge 5417R) für 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die obere, wässrige Phase (mit der RNA) abgenommen und in neue 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Durch die Zugabe von 500 μl Isopropanol wurde die RNA bei -20 °C über Nacht gefällt. Am folgenden Tag wurden die RNA-Proben bei 13000 rpm (Centrifuge 5417R) für 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde daraufhin verworfen und die RNA mit 1 ml einer 70%igen Ethanol-Lösung gewaschen. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt. Im Anschluss wurden die RNA-Pellets für 15 Minuten auf dem Kopf stehend getrocknet, bevor sie in 30 μl RNase-freiem Wasser gelöst wurden.

4.5.2 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die RNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch mittels Nanodrop.

4.5.3 Reverse Transkription (Umschreiben der RNA in cDNA)

Für die Quantifizierung der mRNA-Expression mittels quantitativer real-time PCR wurde die isolierte RNA zunächst mit Hilfe des High-Capacity cDNAse Reverse Transkriptase-Kits (Applied Biosystems™) in cDNA umgeschrieben. Der Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese wird in Tabelle 16 beschrieben.

Tabelle 16: Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese

	Endkonzentration	Volumen (μl) / Probe
10 x RT-Puffer	1 x	2 μl
25 x dNTP-Mix (100 mM)		0,8 μl
10 x RT Random-Primer	1 x	2 μl
Multi-Scribe Reverse Transkriptase		0,5 μl
Wasser		4,7 μl

Für die PCR wurden jeweils 10 μl des Reaktionsansatzes und 10 μl einer auf 50 ng/ μl verdünnten RNA eingesetzt. Anschließend wurde die PCR mit dem in Tabelle 17 aufgeführten Programm gestartet.

Tabelle 17: PCR-Programm zur cDNA-Synthese

	Temperatur	Dauer
Anlagerung der Primer an die RNA	25 °C	10 min
Reverse Transkription	37 °C	120 min
Inaktivierung der Reversen Transkriptase	85 °C	5 min
Kühlung	14 °C	∞

Im Anschluss an die PCR wurden die cDNA-Reaktionsgefäße erneut bei -20 °C tiefgefroren.

4.5.4 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

Eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte zur nachfolgenden Sequenzierung oder quantitativen Bestimmung. Zur quantitativen Bestimmung der CAT-1-mRNA-Expression wurde eine qRT-PCR nach der Methode des Förster-Resonanzenergietransfers (FRET) durchgeführt. Dafür wurde eine Taq-DNA-Polymerase (New England BioLabs) verwendet. Es wurden jeweils 2 µl der cDNA-Proben mit 23 µl eines spezifischen Reaktionsansatzes in die qRT-PCR eingesetzt. Der Reaktionsansatz ist Tabelle 18 zu entnehmen.

Tabelle 18: Reaktionsansatz für die qRT-PCR

	Endkonzentration	Volumen (µl) / Probe
2 x Taq-Puffer	1 x	12,5 µl
as-Primer	0,4 µM	2 µl
ss-Primer	0,4 µM	2 µl
taq-Sonde	0,2 µM	1 µl
dNTPS	10 mM (jeweils)	1 µl
taq-Polymerase		0,5 µl

Die TaqMan-Sonden binden an die komplementäre cDNA zwischen sense- und antisense-Primer. Sie besitzen am 3'-Ende den Quencher TAMRA (5-Carboxytetramethylrhodamin) und am 5'-Ende den Reporter FAM (6-Carboxyfluorescein). Normalerweise wird die Fluoreszenz des Reporters FAM durch den Quencher unterdrückt. Kommt es jedoch im Zuge der Amplifikation zu einem Abbau des FAM-Reporters am 3'-Ende der Sonde (durch eine 5'-3'-Exonuclease-Aktivität der taq-Polymerase), entsteht eine räumliche Distanz zwischen Reporter und

Quencher, woraufhin der FAM-Reporter fluoresziert. Durch die Menge an detektierter Fluoreszenz kann auf die Menge an vorhandener cDNA zurückgeschlossen werden. Für den qRT-PCR-Ansatz wurden die sense (ss)- bzw. antisense (as)-Primer, CAT-1-Sonden und dNTPs (100 mM-Stocklösung) im Verhältnis 1:10 in RNAase-freiem Wasser verdünnt. Neben dem zu untersuchenden CAT-1-Gen wurden die Haushaltsgene GAPDH und β 2-Mikroglobulin (B2M) analysiert. Der Programmablauf der qRT-PCR ist Tabelle 19 zu entnehmen.

Tabelle 19: PCR-Programm der qRT-PCR

	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	1 x
Denaturierung	94 °C	15 s	45 x
Anlagerung, Elongation	60 °C	1 min	45 x
Abkühlung	4 °C	∞	

Die Auswertung der qRT-PCR erfolgte nach der $2(-\Delta\Delta C(T))$ -Methode nach Livak. Dabei wird die Expression des Ziel-Gens (in diesem Fall CAT-1) durch den Bezug auf ein Referenz-Gen (in diesem Fall GAPDH oder B2M) normalisiert. Im Anschluss konnten die Expressionsunterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsbedingungen verglichen werden.

Verwendete CAT-1-Sonden und as-/ss-Primer:

Sonde (CAT-1_Sonde_4): [FAM] CTG GAC CAG GGC ACC TGG GT [TAM] (20)

Primer (CAT-1_ss_4): TCT CAT TTA AGG TTC CCT TCC TGC (24)

Primer (CAT-1_as_4): CAG CAT CCA CAC AGC AAA CC (20)

Sonde (CAT-1_Sonde_7): [FAM] CCG TGG TCA CGG GCG TCA TC [TAM] (20)

Primer (CAT-1_ss_7): CTG CAT TGT GAC CGT GCT TG (20)

Primer (CAT-1_as_7): AGG AAG GGA ACC TTA AAT GAG AGC (24)

4.6 Messung der Proliferation der Zellen mit Hilfe des [³H]-Thymidin-Assays

Die Zellproliferation wurde durch den Einbau von [³H]-markiertem Thymidin gemessen. Dafür wurden jeweils $2,5 \times 10^4$ Zellen in $200 \mu\text{l}$ Medium über 48 und 96 Stunden in einer 96-Lochplatte inkubiert. Pro Bedingung wurden Triplikate angesetzt. Nach der Inkubationszeit wurde jeweils $1 \mu\text{Ci}$ von [³H]-markiertem Thymidin (Perkin Elmer) hinzugegeben. Dabei handelt es sich um einen DNA-Baustein, der während der Zellteilung in die neusynthetisierte DNA eingebaut wird und daher als Marker für die Proliferation der Zellen dient. Je mehr [³H]-markiertes Thymidin in die DNA eingebaut wird, desto stärker proliferieren die Zellen. Die Menge des eingebauten Tritiums lässt sich über die emittierte β -Strahlung mit Hilfe eines Counters (TopCount) bestimmen. Nach Zugabe von $1 \mu\text{Ci}$ von [³H]-markiertem Thymidin wurde die 96-Lochplatte für 16 Stunden im Inkubator (Temperatur = $37 \text{ }^\circ\text{C}$, CO_2 -Gehalt = 5 %) inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde die Platte entnommen und die inkubierten Zellen jeweils in $1,5 \text{ ml}$ -Reaktionsgefäße überführt. Daraufhin wurde in jedes Reaktionsgefäß 1 ml einer $1 \times \text{PBS}$ -Lösung mit 2 % FCS hinzugegeben. Die Zellen wurden mit 2000 rpm zentrifugiert (Heraeus Biofuge Fresco, 5 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$) und der Überstand verworfen. Dieser Waschvorgang wurde daraufhin mit der PBS-Lösung + 2 % FCS noch zweimal wiederholt. Im Anschluss wurde das Zellpellet in $200 \mu\text{l}$ einer 2%igen SDS-Lösung lysiert und in Szintillations-Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 2 ml einer Szintillationsflüssigkeit wurden die Röhrchen geschüttelt und die Szintillation mit Hilfe des Counters gemessen.

4.7 Messung der Stoffwechselaktivität der Zellen mit Hilfe des MTT-Assays

Die Quantifizierung der Stoffwechselaktivität der CLL-Zellen erfolgte durch einen MTT-Assay (CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent, Promega). Diese Versuche wurden ebenfalls in Dreifachbestimmung durchgeführt. Dafür wurden jeweils 5×10^4 Zellen in $200 \mu\text{l}$ RPMI-Medium eingesetzt. Das weitere Ansetzen der Versuche entsprach dem des [³H]-Thymidin-Assays.

Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit einem gelben Farbstoff (Tetrazoliumsalz) für circa 1 Stunde bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Während der Inkubation wird der Farbstoff im Zytoplasma der Zellen enzymatisch (NAD(P)H-abhängig) in das wasserunlösliche Formazan (blaue Färbung) reduziert. Die Menge des umgesetzten Farbstoffs korreliert dabei mit der Menge an verfügbarem ATP der Zellen und erlaubt dadurch einen Rückschluss auf die metabolische Aktivität.

Nach der einstündigen Inkubation der Zellen und einem sichtbaren Farbumschlag wurde die Farbintensität mit Hilfe eines Plate-Readers photometrisch bei einer Wellenlänge von 490 nm bestimmt.

4.8 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism Version 8. Erhaltene Messwerte wurden mit One-way ANOVA (Analysis of Variance) und anschließendem Tukey-Test analysiert. Alternativ wurde ein t-Test durchgeführt.

$p > 0,05$ = nicht signifikant (in den Grafiken nicht dargestellt)

$p < 0,05$ = signifikant (in den Grafiken als * dargestellt)

$p < 0,01$ = sehr signifikant (in den Grafiken als ** dargestellt)

$p < 0,001$ = hoch signifikant (in den Grafiken als *** dargestellt)

$p < 0,0001$ = höchst signifikant (in den Grafiken als **** dargestellt)

Die im Folgenden angegebenen Werte zur Zu- oder Abnahme der Viabilität, Proliferation, mRNA- bzw. Proteinexpression und Stoffwechselaktivität sind jeweils relativ zur DMSO-Kontrolle, da die Inhibitoren in DMSO gelöst vorlagen. Die Effekte der einzelnen Inhibitoren auf die Viabilität, Proliferation und CAT-1-Proteinexpression sind durch die „Mittelwertsdifferenz \pm Standardabweichung der Mittelwertsdifferenz“ angegeben.

5 Ergebnisse

5.1 Starke Expression von Signaltransduktionsproteinen des PI3K/Akt-, BZR- und NF- κ B-Signalwegs in der CLL-Zelllinie HG3

Zunächst wurde die Aktivierung einzelner Signaltransduktionswege in lymphatischen Zelllinien (CLL-Zelllinien: HG3, JVM-2, MEC1; Myelom-Zelllinien: FD50, NCI-A2) untersucht. Dazu wurden der PI3K/Akt-, der B-Zell-Rezeptor- sowie der NF- κ B-Signalweg betrachtet, denen eine entscheidende Rolle in der Proliferation und Viabilität der Tumorzellen zukommt (Kapitel 2.4). Zur Messung der Aktivität erfolgte die semiquantitative Messung der Proteinexpression bzw. Phosphorylierung einzelner Kinasen der Signalwege mit Hilfe einer SDS-PAGE und anschließender Western Blot-Analyse. Die Analyse der Aktivität des PI3K/Akt-Signalwegs erfolgte über die Proteinexpression von pAkt (Ser473) und pAkt (Thr308), die des B-Zell-Rezeptor-Signalwegs über die Expression von pPLC γ 2 und die des NF- κ B-Signalwegs über die Expression von pI κ B α (Kapitel 2.4).

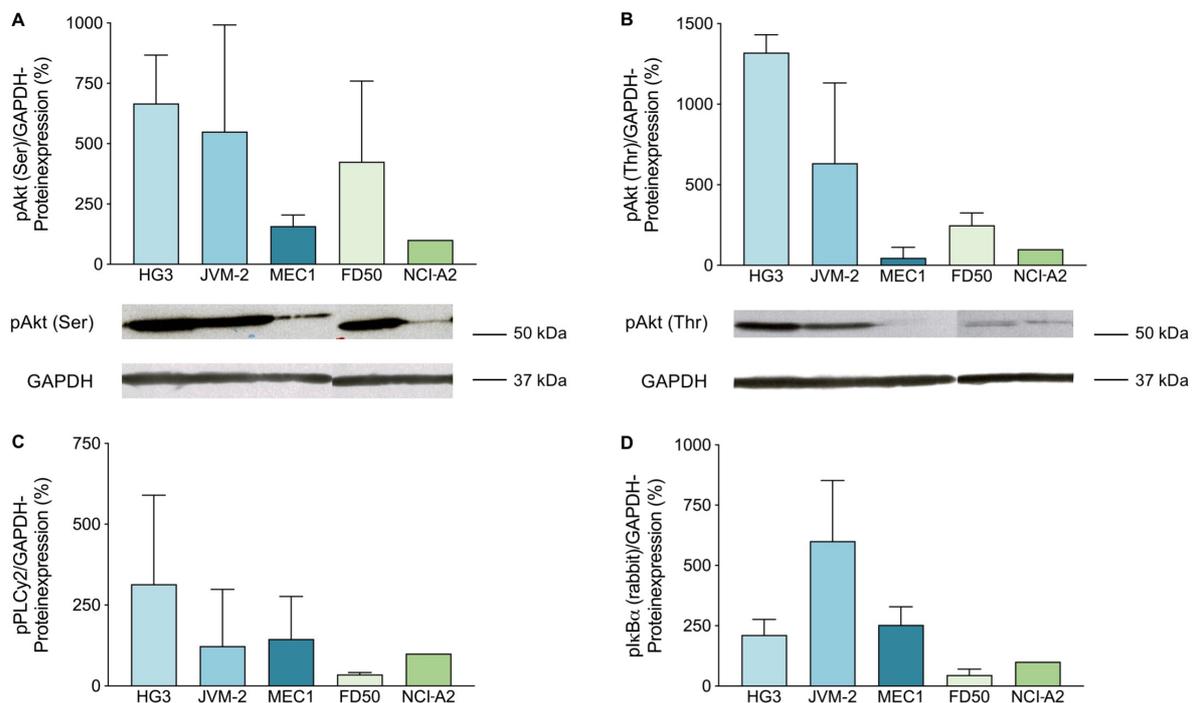


Abbildung 8: Analyse der Phosphorylierung relevanter Signaltransduktionsproteine (pAkt (Ser473), pAkt (Thr308), pPLC γ 2, pI κ B α) in CLL- (HG3, JVM-2, MEC1) und MM-Zelllinien (FD50, NCI-A2).

Zellen der CLL-Zelllinien HG3, JVM-2 und MEC1 sowie der MM-Zelllinien FD50 und NCI-A2 wurden lysiert und anschließend die Expression von pAkt (Ser473), pAkt (Thr308), pPLC γ 2 und pI κ B α im Western Blot ermittelt. Gezeigt ist die quantitative Auswertung der Expression von A) pAkt (Ser473), B) pAkt (Thr308), C) pPLC γ 2 und D) pI κ B α , jeweils in Bezug zu GAPDH (Mittelwerte \pm Standardabweichungen, n = 2 unabhängige Versuche). Dargestellt ist die relative Expression der phosphorylierten Proteine der einzelnen Zelllinien jeweils in Bezug auf die Expression in den NCI-A2-Zellen (entspricht 100 %). Repräsentativ sind die WB-Banden von pAkt (Ser473) (60 kDa) und pAkt (Thr308) (60 kDa) sowie GAPDH (37 kDa) gezeigt.

Die im Vergleich zu den anderen Zelllinien erhöhte Proteinexpression bzw. verstärkte Phosphorylierung der Signaltransduktionsproteine pAkt (Ser473) und pAkt (Thr308) legte eine hohe Aktivität des PI3K/Akt-Signalwegs in den CLL-Zelllinien HG3 und JVM-2 nahe (Abbildung 8A, 8B). Lediglich die Myelom-Zelllinie FD50 zeigte ebenfalls eine verstärkte Phosphorylierung von pAkt (Ser473). Die Phosphorylierung von pPLC γ 2 war ebenfalls im Vergleich zu den restlichen lymphatischen Zelllinien in der CLL-Zelllinie HG3 am stärksten (Abbildung 8C), was auf eine hohe Aktivität des B-Zell-Rezeptor-Signalwegs in der Zelllinie hindeutete. Der NF- κ B-Signalweg schien in den HG3-Zellen im Vergleich zur CLL-Zelllinie JVM-2 schwächer aktiviert zu sein (Abbildung 8D). Die Myelom-Zelllinien FD50 und NCI-A2 zeigten im Vergleich zu den anderen Zelllinien eine schwache Phosphorylierung von pPLC γ 2 und pI κ B α , woraus sich eine verminderte Aktivität der beiden Signalwege vermuten ließ.

Aufgrund des Phosphorylierungsstatus der drei untersuchten Signalwege in der CLL-Zelllinie HG3 habe ich mich in meinen weiteren Experimenten auf die Arbeit mit dieser Zelllinie und diesen Signalwegen konzentriert. Zudem wurde die HG3-Zelllinie gewählt, da die Bedeutung des CAT-1-Transporters in CAT-1-k.o.-Experimenten mit dieser Zelllinie bereits beschrieben wurde [10].

5.2 Analyse der Effekte eines Argininmangels auf die CAT-1-Proteinexpression der CLL-Zelllinie HG3

Die Regulation der CAT-1-Expression ist unter anderem von dem Vorhandensein von Aminosäuren abhängig. In C6-Glioma-Zellen kommt es bei Aminosäuremangel zu einer verstärkten Transkription, mRNA-Stabilität und Translation des Transporters [68]. Zudem wurde bereits gezeigt, dass ein Argininmangel zu einer Überexpression der CAT-1-mRNA in aktivierten T-Lymphozyten führt [169]. Zur Validierung und Bestätigung dieser Ergebnisse in der CLL-Zelllinie HG3 wurde die Viabilität und CAT-1-Proteinexpression der Zellen in Abhängigkeit von Arginin untersucht.

5.2.1 Argininmangel hemmt die Viabilität der CLL-Zelllinie HG3

Zur Beurteilung der Viabilität wurden die HG3-Zellen über einen Zeitraum von 24 und 48 Stunden mit oder ohne 1 mM Arginin inkubiert. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Quantifizierung PI- und Annexin-V-positiver Zellen.

Dabei zeigte sich ein signifikanter Anstieg frühapoptotischer Zellen bei Inkubation der HG3-Zelllinie in Argininmangelmedium über 24 und 48 Stunden (Zunahme nach

24 h: $14,3 \pm 2,6$ %, Zunahme nach 48 h: $26,8 \pm 6,2$ %) (Abbildung 9A, 9C). Der Anteil toter Zellen war nach 24 und 48 Stunden Inkubation unter Argininmangel nicht signifikant erhöht (Abbildung 9B, 9D).

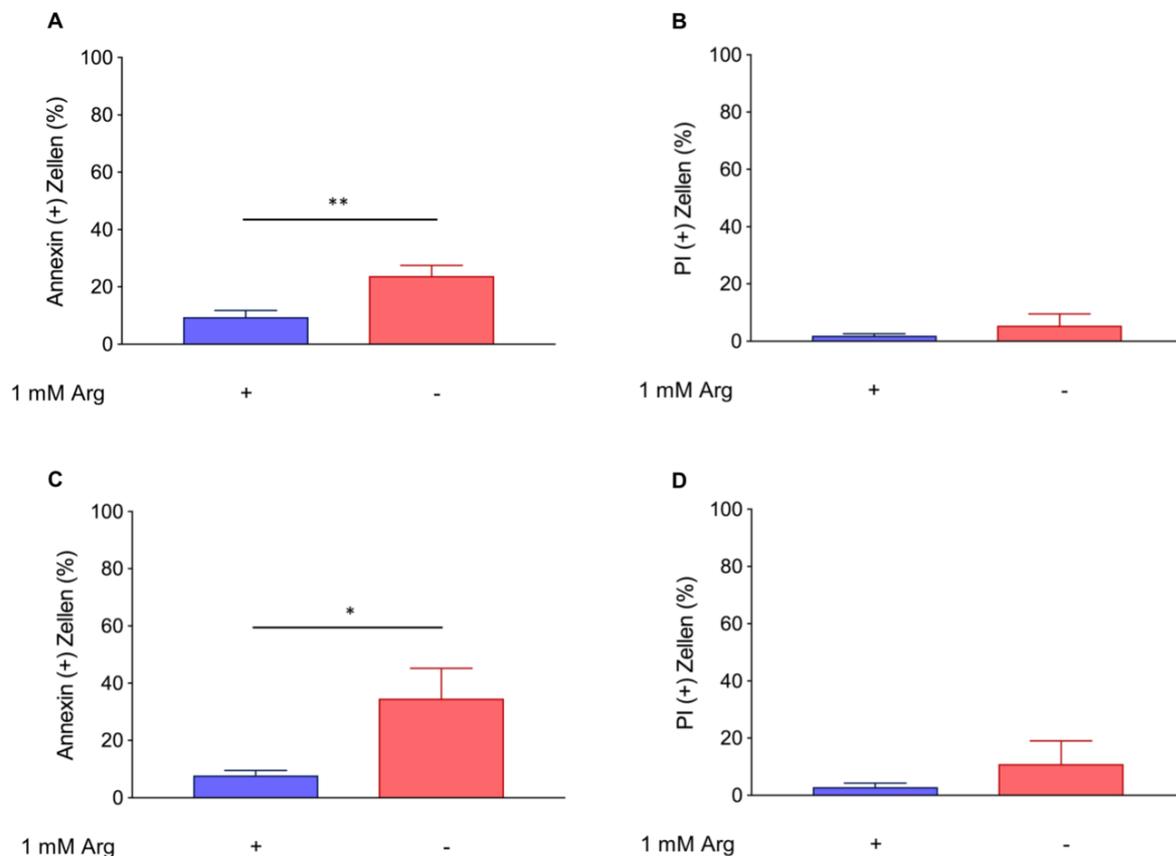


Abbildung 9: Die Viabilität der CLL-Zelllinie HG3 wird bei Argininmangel gehemmt.

HG3-Zellen wurden über 24 und 48 h in der An- oder Abwesenheit von 1 mM Arginin (Arg) inkubiert. Anschließend wurde die Viabilität der Zellen nach A,B) 24 und C,D) 48 h durch die durchflusszytometrische Messung von A,C) Annexin-V- und B,D) Propidiumiodid-positiver Zellen festgestellt (Mittelwerte \pm Standardabweichungen, $n = 3$ unabhängige Versuche). Die statistische Auswertung erfolgte durch einen t-Test. Es wurden die Zellen bei Kultivierung mit 1 mM Arg mit den Zellen bei Kultivierung ohne 1 mM Arg verglichen (**: $p \leq 0,01$; *: $p \leq 0,05$).

Ein Argininmangel führte sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden Inkubation zu einer Induktion der Apoptose und Hemmung der Viabilität der CLL-Zelllinie HG3. Die Ergebnisse ließen eine stärkere Induktion der Apoptose in den HG3-Zellen bei zunehmender Inkubationszeit in Argininmangelmedium vermuten.

5.2.2 Argininmangel induziert die CAT-1-Proteinexpression der CLL-Zelllinie HG3

Der Arginintransporter CAT-1 wird sowohl in immortalisierten CLL-Zelllinien (HG3, MEC-1 und JVM-2) als auch in TLR9-aktivierten, primären CLL-Zellen exprimiert. Zur Beurteilung einer möglichen Regulation der CAT-1-Proteinexpression in Abhängigkeit von Arginin wurde eine SDS-PAGE mit anschließender Western Blot-Analyse durchgeführt. Dazu wurden die HG3-Zellen für 24 und 48 Stunden mit oder ohne 1 mM Arginin inkubiert.

Sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden Inkubation in Argininmangelmedium zeigten die HG3-Zellen eine nicht signifikant verstärkte Expression des CAT-1 (Zunahme nach 24 h: $39,7 \pm 25,3$ %, Zunahme nach 48 h: $133,4 \pm 68,6$ %) (Abbildung 10). Es ließ sich eine verstärkte Induktion der CAT-1-Proteinexpression bei zunehmender Inkubationszeit in Argininmangelmedium vermuten.

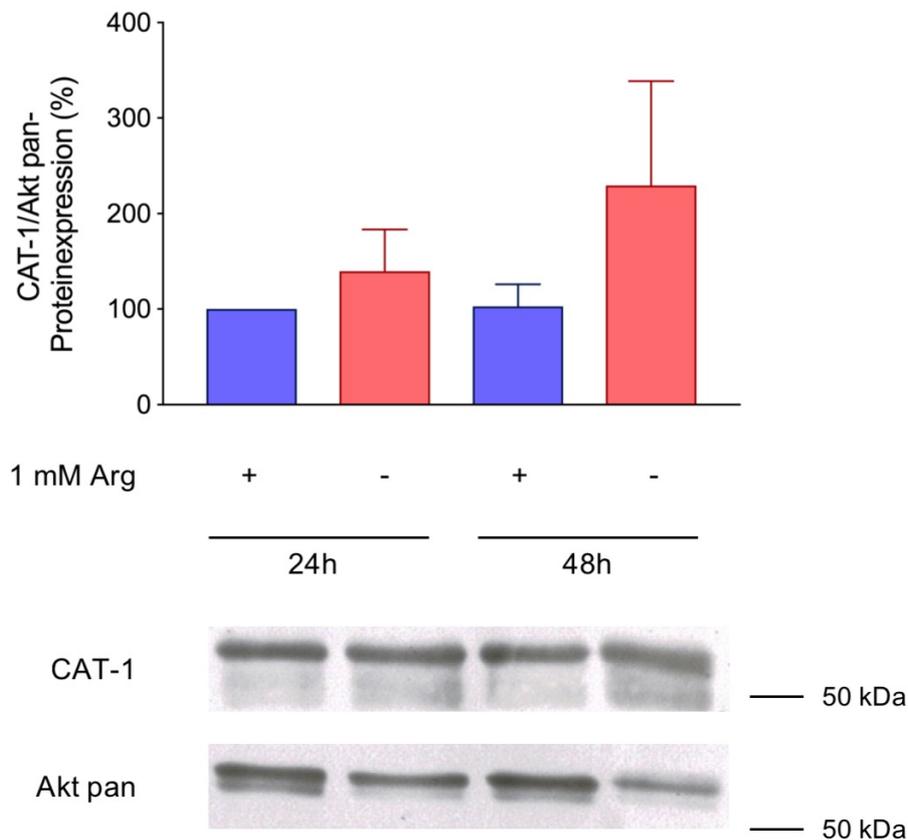


Abbildung 10: Die CAT-1-Proteinexpression der CLL-Zelllinie HG3 wird bei Argininmangel induziert. HG3-Zellen wurden über 24 und 48 h in der An- oder Abwesenheit von 1 mM Arginin (Arg) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Proteinexpression von CAT-1 relativ zur Akt-Expression (als Ladekontrolle) im Western Blot ermittelt. Gezeigt ist die quantitative Messung der CAT-1-Proteinexpression nach 24 und 48 h in An- oder Abwesenheit von Arginin (Mittelwerte \pm Standardabweichungen, $n = 3$ unabhängige Versuche). Die statistische Auswertung erfolgte mit One-way-Anova und anschließendem Tukey-Test. Es wurden die Zellen, welche 24 h in der Anwesenheit von 1 mM Arginin inkubiert wurden, mit den Zellen ohne 1 mM Arginin nach 24 und 48 h sowie den Zellen nach Kultivierung mit 1 mM Arginin über 48 h verglichen. Repräsentative Western Blot-Analysen für CAT-1 (55 kDa) und Akt pan (60 kDa).

Aufgrund einer fehlenden, signifikanten Veränderung der CAT-1-Proteinexpression bei Argininmangel und eines zunehmenden Zelltodes in vitro bei längerer Inkubationszeit in Argininmangelmedium wurde im weiteren Verlauf der Experimente von einer Untersuchung der CAT-1-Proteinexpression bei Argininmangel abgesehen.

5.3 Analyse der Effekte des Akt-Inhibitors auf die CAT-1-Expression der CLL-Zelllinie HG3

Der PI3K/Akt-Signalweg stellt einen der zentralen Signalwege zur Regulation von Wachstum und Proliferation, Hemmung der Apoptose und Regulation des Metabolismus in CLL-Zellen dar (Kapitel 2.4.1).

Der in den folgenden Experimenten verwendete Akt-Inhibitor Akti-1/2 hemmt die Bindung von inaktivem Akt über die PH-Domäne an das membranständige PIP₃, wodurch Akt nicht an den Phosphorylierungsstellen Serin-473 und Threonin-308 phosphoryliert und damit aktiviert werden kann.

5.3.1 Die Inhibition des PI3K/Akt-Signalwegs reduziert die Viabilität der CLL-Zelllinie HG3

Zur durchflusszytometrischen Messung der Viabilität wurden die HG3-Zellen für 6, 24, 48 und 96 Stunden mit dem Akt-Inhibitor in RPMI-Medium inkubiert. Aufgrund der in Vorversuchen beobachteten, schlechten Viabilität der unbehandelten Kontrollzellen wurde das Medium aller Versuchsbedingungen nach 48 Stunden erneuert.

Zu Beginn der Versuche mit dem Akt-Inhibitor wurden Dosisfindungsversuche (5 μ M, 10 μ M, 20 μ M und 30 μ M) durchgeführt. Dabei wurde eine Konzentration des Inhibitors ermittelt, welche den Akt-Signalweg effektiv inhibiert, gleichzeitig jedoch ausreichend viable Zellen (> 70 %) nach der Inkubationszeit für die weiteren Analysen ermöglicht. Eine effektive Inhibition des Signalwegs bei gleichzeitig ausreichender Viabilität der HG3-Zellen zeigte sich bei Inkubation mit 10 μ M und 20 μ M Akt-Inhibitor. Da der Akt-Inhibitor in DMSO gelöst vorlag, wurde dem Versuchsansatz eine DMSO-Kontrolle entsprechend der maximal eingesetzten DMSO-Menge (hier 0,4 % DMSO = 4 μ l/ml) hinzugefügt.

Nach 6 Stunden Inkubation der HG3-Zellen mit dem Akt-Inhibitor zeigte sich kein signifikanter Anstieg frühapoptotischer Zellen (Abbildung 11A). Dabei konnte jedoch eine signifikante Zunahme toter Zellen (Zunahme: $3,3 \pm 1,6$ %) bei Inkubation mit 20 μ M Akt-Inhibitor beobachtet werden (Abbildung 11B). Nach 24 Stunden kam es zu einem signifikanten Anstieg frühapoptotischer (Zunahme bei 20 μ M Akt-Inhibitor: $21,6 \pm 11,2$ %) und toter Zellen (Zunahme bei 20 μ M Akt-Inhibitor: $11,4 \pm 7,0$ %) (Abbildung 11C, 11D). Während es nach 48 und 96 Stunden Inkubation der HG3-Zellen mit dem Inhibitor zu einer weiteren signifikanten Zunahme der

frühapoptotischen Zellen kam (Zunahme nach 48 Stunden bei 20 μM Akt-Inhibitor: $19,8 \pm 4,1$ %, Zunahme nach 96 Stunden: $26,9 \pm 16,7$ %) (Abbildung 11E, 11G), stieg der Anteil toter Zellen nicht weiter an (Abbildung 11F, 11H).

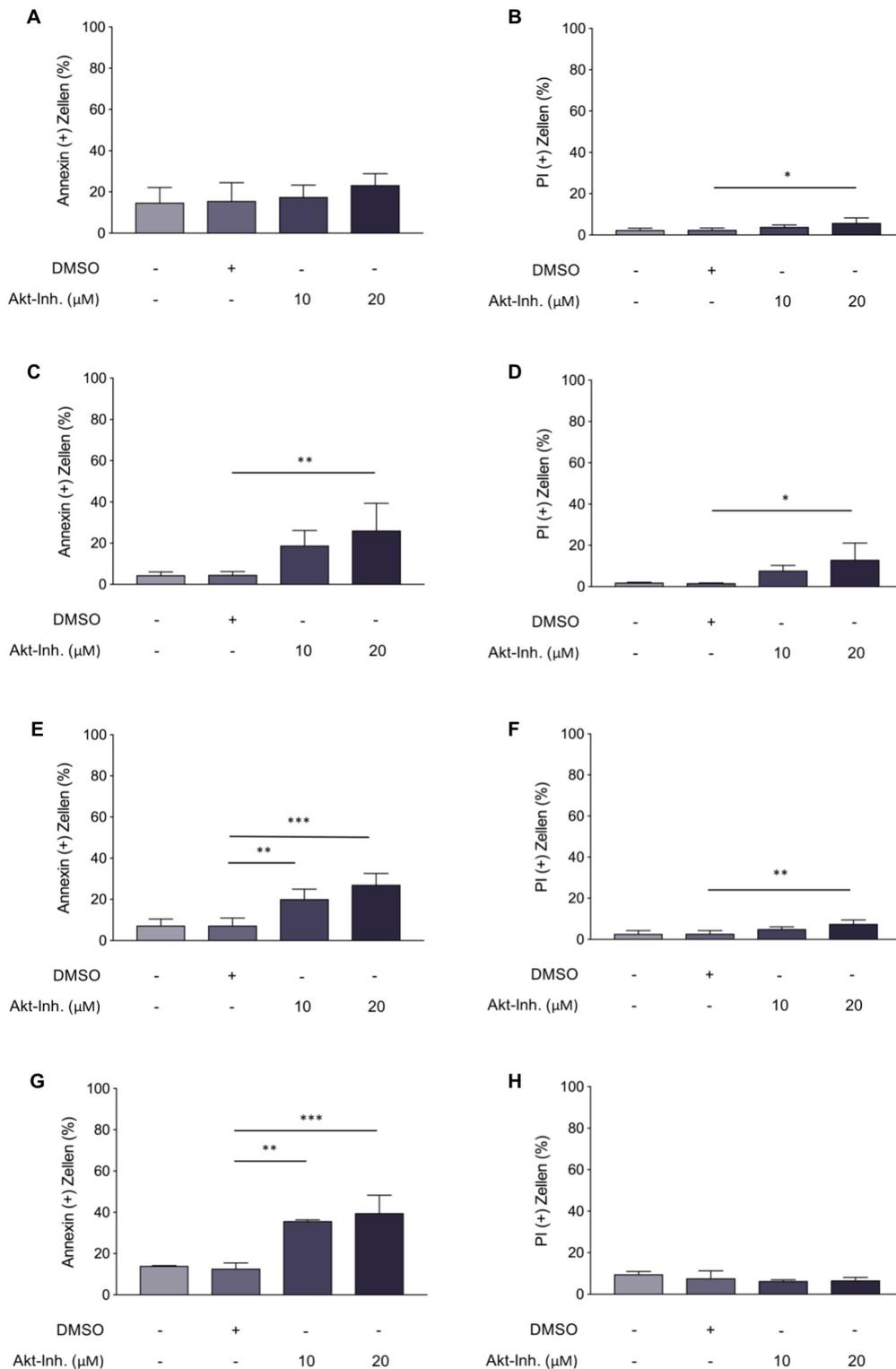


Abbildung 11: Die Viabilität der CLL-Zelllinie HG3 wird durch den Akt-Inhibitor gehemmt.

HG3-Zellen wurden über 6, 24, 48 und 96 h in der An- oder Abwesenheit von 10 μM , 20 μM Akt-Inhibitor oder 0,4 % DMSO als Kontrolle inkubiert. Anschließend wurde die frühe Apoptose bzw. der Zelltod der Zellen nach A,B) 6, C,D) 24, E,F) 48 und G,H) 96 h durch die durchflusszytometrische Messung von A,C,E,G) Annexin-V- und B,D,F,H) Propidiumiodid-positiven Zellen festgestellt (Mittelwerte \pm Standardabweichungen, $n = 4$ unabhängige Versuche). Die statistische Auswertung erfolgte mit One-way-Anova und anschließendem Tukey-Test. Es wurden die Zellen, welche in der Gegenwart des Akt-Inhibitors inkubiert wurden, jeweils mit der DMSO-Kontrolle verglichen (***: $p \leq 0,001$; **: $p \leq 0,01$; *: $p \leq 0,05$).

Die HG3-Zellen zeigten bei Inkubation mit dem Akt-Inhibitor (10 μM , 20 μM) zu allen Zeitpunkten eine ausreichende Viabilität (mindestens $86,9 \pm 7,0$ % viable Zellen), weshalb die Zellen zur Proliferationsmessung durch [^3H]-Thymidin-Assay und zur Analyse der CAT-1-Expression auf Protein- und mRNA-Ebene isoliert werden konnten. DMSO zeigte bei allen Inkubationszeiten keinen signifikanten Einfluss auf die Viabilität der HG3-Zellen.

5.3.2 Die Inhibition des PI3K/Akt-Signalwegs reduziert die Proliferation der CLL-Zelllinie HG3

Die Messung der Proliferation der HG3-Zellen bei Inkubation mit dem Akt-Inhibitor erfolgte durch einen [^3H]-Thymidin-Assay. Dafür wurden HG3-Zellen über 48 und 96 Stunden in der An- oder Abwesenheit des Akt-Inhibitors (10 μM , 20 μM) inkubiert. Dabei wurde die Kontrollbedingung der unbehandelten Zellen gleich 100 % gesetzt (entspricht 228634 ± 31323 cpm nach 48 h und 256592 ± 45220 cpm nach 96 h). Bereits nach 48-stündiger Inkubation zeigte sich im Vergleich zur DMSO-Kontrolle eine signifikante Reduktion der Proliferation der HG3-Zellen (Abnahme bei 10 μM Akt-Inhibitor: $79,8 \pm 47,1$ %, Abnahme bei 20 μM Akt-Inhibitor: $91,0 \pm 29,0$ %) (Abbildung 12A). Bei einer längeren Inkubationszeit über 96 Stunden wurde diese Proliferationshemmung weiter verstärkt (Abnahme bei 10 μM Akt-Inhibitor: $86,7 \pm 21,7$ %, Abnahme bei 20 μM Akt-Inhibitor: $99,0 \pm 22,3$ %) (Abbildung 12B).

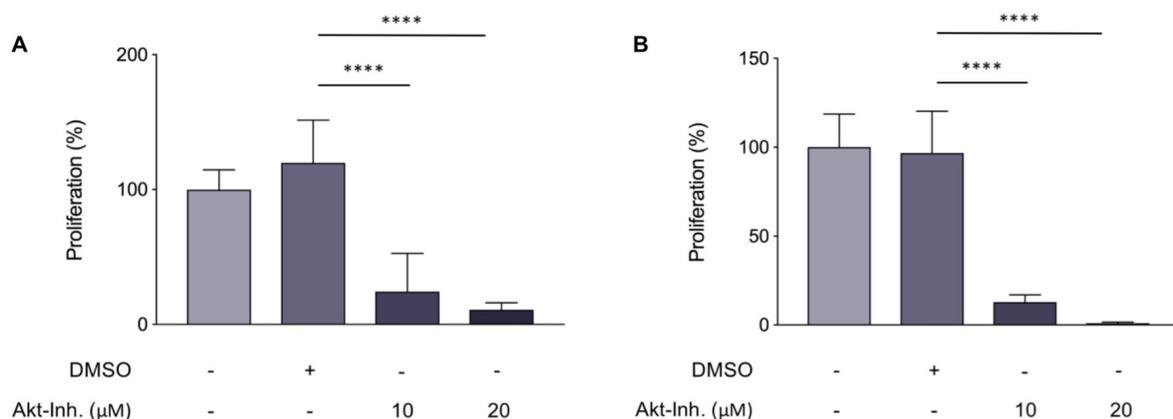


Abbildung 12: Die Proliferation der CLL-Zelllinie HG3 wird durch den Akt-Inhibitor gehemmt.

HG3-Zellen wurden über 48 und 96 h in der An- oder Abwesenheit von 10 μM , 20 μM Akt-Inhibitor oder 0,4 % DMSO als Kontrolle inkubiert. Die Proliferation wurde anschließend durch den Einbau von [^3H]-Thymidin über 16 h ermittelt. Gezeigt ist die quantitative Messung der Proliferation bei Inkubation mit dem Akt-Inhibitor nach A) 48 h und B) 96 h (Mittelwerte \pm Standardabweichungen, $n = 3$ unabhängige Versuche). Die statistische Auswertung erfolgte mit One-way-Anova und anschließendem Tukey-Test. Es wurden jeweils die Zellen, welche in der Gegenwart des Akt-Inhibitors inkubiert wurden, mit der DMSO-Kontrolle verglichen. Zum Vergleich der einzelnen Bedingungen wurde dabei jeweils die Kontrollbedingung der unbehandelten Zellen gleich 100 % gesetzt (entspricht 228634 ± 31323 cpm nach 48 h und 256592 ± 45220 cpm nach 96 h) (****: $p \leq 0,0001$).

Bereits die Inkubation mit 10 μM Akt-Inhibitor führte zu einer signifikanten Hemmung der Proliferation der HG3-Zellen. Eine Dosiserhöhung konnte die Proliferationshemmung weiter verstärken, was bei Inkubation mit 20 μM Akt-Inhibitor zu einer fast vollständig aufgehobenen Proliferation nach 96 Stunden führte. DMSO zeigte sowohl nach 48 als auch nach 96 Stunden Inkubation keinen Einfluss auf die Proliferation der HG3-Zellen.

5.3.3 Die Inhibition des PI3K/Akt-Signalwegs reduziert die CAT-1-Proteinexpression der CLL-Zelllinie HG3

Der PI3K/Akt-Signalweg führt über eine Aktivierung der Proteinbiosynthese zu einer Stimulation des Zellwachstums (Kapitel 2.4.1). Um zu untersuchen, ob der PI3K/Akt-Signalweg auch für die Expression des CAT-1 eine Rolle spielt, wurden die HG3-Zellen für 48 und 96 Stunden mit dem Akt-Inhibitor inkubiert, da für das CAT-1-Protein eine Halbwertszeit von 15,8 Stunden beschrieben wird [170]. Zur Quantifizierung der CAT-1-Proteinexpression wurde eine SDS-PAGE mit anschließender Western Blot-Analyse durchgeführt. Eine wirksame Inhibition des PI3K/Akt-Signalwegs wurde im Western Blot durch die Phosphorylierung von pAkt (Ser473) und pAkt (Thr308) überprüft.

Nach 48-stündiger Inkubation der HG3-Zellen mit dem Akt-Inhibitor zeigte sich im Vergleich zur DMSO-Kontrolle eine Reduktion der CAT-1-Expression um $40,4 \pm 14,5 \%$ bei 10 μM Akt-Inhibitor und $40,3 \pm 14,3 \%$ bei 20 μM Akt-Inhibitor (Abbildung 13A). Eine suffiziente Inhibition des Signalwegs wurde durch die signifikant reduzierte Expression von pAkt (Ser473) und pAkt (Thr308) bestätigt (Abbildung 13B, 13C).

Bei der Inkubation der HG3-Zellen mit dem Akt-Inhibitor über 96 Stunden kam es weiterhin zu einer signifikanten Reduktion der CAT-1-Expression (Abnahme bei 10 μM Akt-Inhibitor: $36,2 \pm 8,1 \%$, Abnahme bei 20 μM Akt-Inhibitor: $46,7 \pm 3,4 \%$) (Abbildung 13D). Eine relevante Hemmung des Signalwegs konnte durch die verminderte Expression von pAkt (Ser473) (Abbildung 13E) und pAkt (Thr308) (Abbildung 13F) gezeigt werden. DMSO zeigte keinen Einfluss auf die Proteinexpression von CAT-1, pAkt (Ser473) oder pAkt (Thr308).

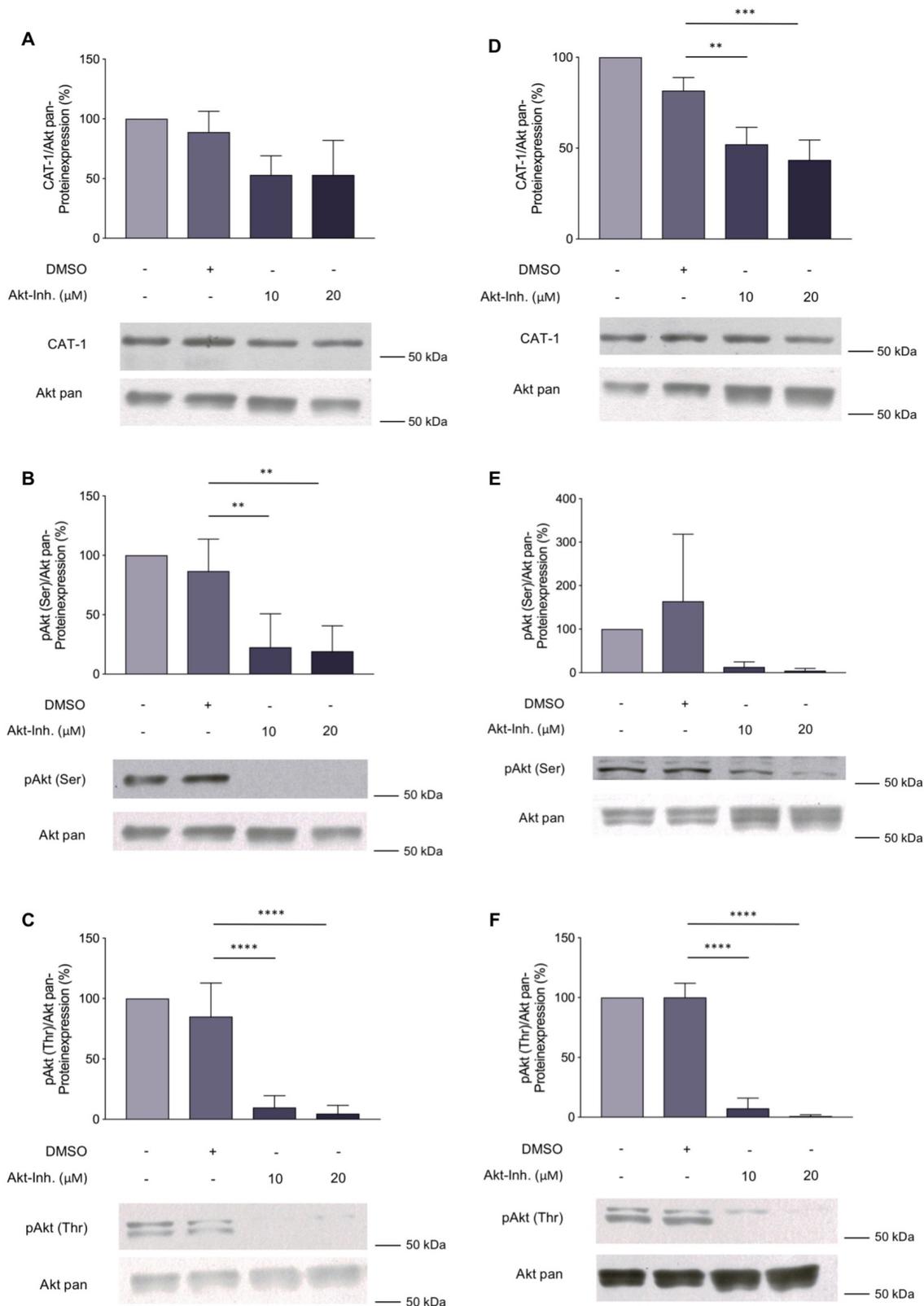


Abbildung 13: Die CAT-1-Proteinexpression der CLL-Zelllinie HG3 wird durch den Akt-Inhibitor gehemmt.

HG3-Zellen wurden über 48 und 96 h in der An- oder Abwesenheit von 10 μM, 20 μM Akt-Inhibitor oder 0,4 % DMSO als Kontrolle inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Proteinexpression von CAT-1, pAkt (Ser473) und pAkt (Thr308) relativ zur Akt-Expression (als Ladekontrolle) im Western Blot ermittelt. Gezeigt ist die quantitative Messung der A) CAT-1-Expression nach 48 h, B) pAkt (Ser473)-Expression nach 48 h, C) pAkt (Thr308)-Expression nach 48 h, D) CAT-1-Expression nach 96 h, E) pAkt (Ser473)-Expression nach 96 h und F) pAkt (Thr308)-Expression nach 96 h (Mittelwerte ± Standardabweichungen, n = 3 unabhängige Versuche). Die statistische Auswertung erfolgte mit One-way-Anova und anschließendem Tukey-Test. Es wurden jeweils die Zellen, welche in der Gegenwart des Akt-Inhibitors inkubiert wurden, mit der DMSO-Kontrolle verglichen. Zum Vergleich der einzelnen Bedingungen wurde dabei jeweils die Kontrollbedingung der unbehandelten Zellen gleich 100 % gesetzt (****: p ≤ 0,0001; ***: p ≤ 0,001; **: p ≤ 0,01). Repräsentative Western Blot-Analysen für CAT-1 (55 kDa), pAkt (Ser473) (60 kDa), pAkt (Thr308) (60 kDa) und Akt pan (60 kDa).

5.3.4 Die Inhibition des PI3K/Akt-Signalwegs zeigt keinen Einfluss auf die CAT-1-mRNA-Expression der CLL-Zelllinie HG3

Zur Quantifizierung der CAT-1-mRNA-Expression wurde eine qRT-PCR durchgeführt. Um zu untersuchen, ob der PI3K/Akt-Signalweg für die Expression des CAT-1 eine Rolle spielt, wurden die HG3-Zellen für 6 und 24 Stunden mit dem Akt-Inhibitor inkubiert, da für die CAT-1-mRNA eine Halbwertszeit zwischen 1 und 4 Stunden beschrieben wird [171] [172] (Dissertation Susanne Muther, 2017).

Sowohl nach 6 Stunden (Abbildung 14A) als auch nach 24 Stunden (Abbildung 14B) Inkubation der HG3-Zellen mit dem Inhibitor zeigte sich kein signifikanter Einfluss des Inhibitors auf die CAT-1-mRNA-Expression.

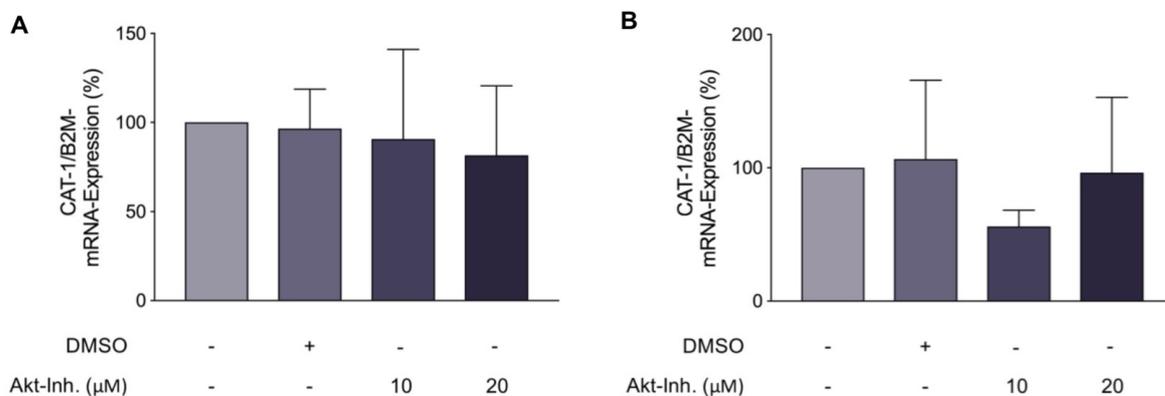


Abbildung 14: Der Akt-Inhibitor zeigt keinen Einfluss auf die CAT-1-mRNA-Expression der CLL-Zelllinie HG3. HG3-Zellen wurden über 6 und 24 h in der An- oder Abwesenheit von 10 μM, 20 μM Akt-Inhibitor oder 0,4 % DMSO als Kontrolle inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die mRNA-Expression von CAT-1 relativ zur B2M-Expression (als Ladekontrolle) in der qRT-PCR ermittelt. Gezeigt ist die quantitative Messung der A) CAT-1-Expression nach 6 h, B) CAT-1-Expression nach 24 h (Mittelwerte ± Standardabweichungen, n = 3 unabhängige Versuche). Die statistische Auswertung erfolgte mit One-way-Anova und anschließendem Tukey-Test. Es wurden jeweils die Zellen, welche in der Gegenwart des Akt-Inhibitors inkubiert wurden, mit der DMSO-Kontrolle verglichen. Zum Vergleich der einzelnen Bedingungen wurde dabei jeweils die Kontrollbedingung der unbehandelten Zellen gleich 100 % gesetzt.

5.4 Analyse der Effekte des BTK-Inhibitors auf die CAT-1-Expression der CLL-Zelllinie HG3

Der B-Zell-Rezeptor-Signalweg stellt einen weiteren zentralen Signalweg in lymphatischen Zellen dar, da er unter anderem die Regulation von Apoptose und der Proliferation der Zellen vermittelt (Kapitel 2.4.3).

Der in den folgenden Experimenten verwendete BTK-Inhibitor Ibrutinib bindet an Cystein-Reste im aktiven Zentrum von BTK, wodurch die Phosphorylierung der Substrate des Enzyms (unter anderem PLC γ 2) inhibiert wird.

5.4.1 Die Inhibition des BZR-Signalwegs zeigt keinen Einfluss auf die Viabilität der CLL-Zelllinie HG3

Zur durchflusszytometrischen Messung der Viabilität wurden die HG3-Zellen für 6, 24, 48 und 96 Stunden mit dem BTK-Inhibitor in RPMI-Medium inkubiert. Aufgrund der in Vorversuchen beobachteten, schlechten Viabilität der unbehandelten Kontrollzellen wurde das Medium aller Versuchsbedingungen nach 48 Stunden erneuert.

Zudem wurden auch mit dem BTK-Inhibitor Dosisfindungsversuche (2,5 μ M, 5 μ M, 10 μ M) durchgeführt. Eine suffiziente Inhibition des Signalwegs (nachgewiesen durch eine Suppression der pPLC γ 2-Proteinexpression und eine Hemmung der Proliferation) bei gleichzeitig ausreichender Viabilität der HG3-Zellen (> 70 %) zeigte sich bei 5 μ M und 10 μ M BTK-Inhibitor. Da der BTK-Inhibitor in DMSO gelöst vorlag, wurde dem Versuchsansatz eine DMSO-Kontrolle entsprechend der maximal eingesetzten DMSO-Menge (hier 0,2 % DMSO = 2 μ l/ml) hinzugefügt.

Nach 6-stündiger Inkubation der HG3-Zellen mit dem BTK-Inhibitor zeigte sich weder ein signifikanter Anstieg frühapoptotischer noch toter Zellen (Abbildung 16A, 16B). Bei einer längeren Inkubation der Zellen mit 10 μ M BTK-Inhibitor über 24 Stunden kam es zu einer nicht signifikanten Zunahme frühapoptotischer (Zunahme: 10,9 \pm 7,3 %) und toter Zellen (Zunahme: 5,3 \pm 5,0 %) (Abbildung 15C, 15D). Nach 48 und 96 Stunden Inkubation der HG3-Zellen mit dem BTK-Inhibitor zeigte sich keine Zunahme frühapoptotischer Zellen und toter Zellen (Abbildung 15E, 15F, 15G, 15H). Bei 96-stündiger Inkubation ließ sich sogar eine signifikante Abnahme des Anteils toter HG3-Zellen detektieren (Abnahme: 4,4 \pm 3,5 %) (Abbildung 15H).

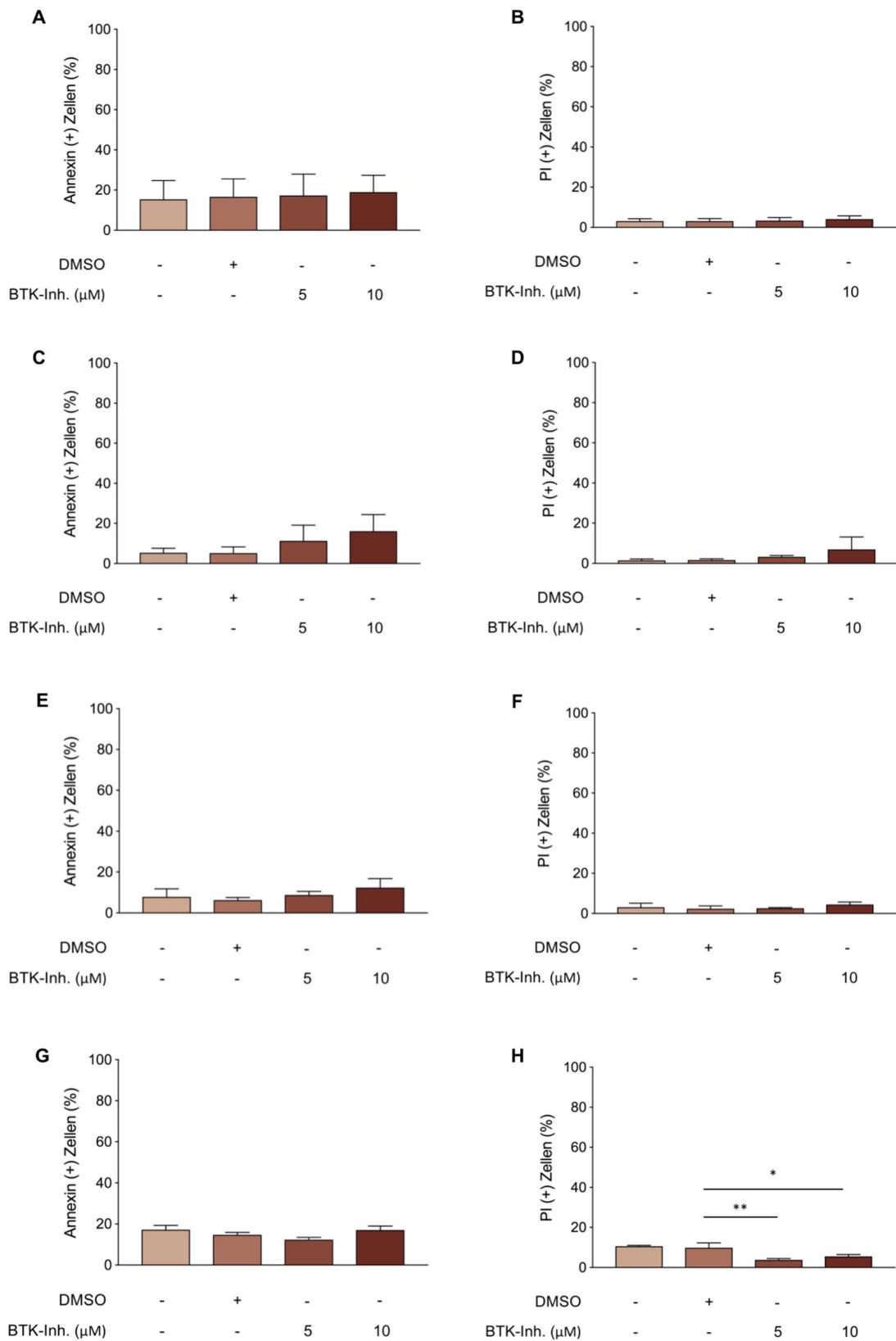


Abbildung 15: Der BTK-Inhibitor zeigt keinen Einfluss auf die Viabilität der CLL-Zelllinie HG3.

HG3-Zellen wurden über 6, 24, 48 und 96 h in der An- oder Abwesenheit von 5 μM, 10 μM BTK-Inhibitor oder 0,2 % DMSO als Kontrolle inkubiert. Anschließend wurden die frühe Apoptose bzw. der Zelltod der Zellen nach A,B) 6, C,D) 24, E,F) 48 und G,H) 96 h durch die durchflusszytometrische Messung von A,C,E,G) Annexin-V- und B,D,F,H) Propidiumiodid-positiven Zellen festgestellt (Mittelwerte ± Standardabweichungen, n = 3 unabhängige Versuche). Die statistische Auswertung erfolgte mit One-way-Anova und anschließendem Tukey-Test. Es wurden jeweils die Zellen, welche in der Gegenwart des BTK-Inhibitors inkubiert wurden, mit der DMSO-Kontrolle verglichen (**: p ≤ 0,01; *: p ≤ 0,05).

Die HG3-Zellen zeigten bei Inkubation mit dem BTK-Inhibitor (5 μM , 10 μM) zu allen Zeitpunkten eine ausreichende Viabilität (mindestens: $93,0 \pm 5,4$ % viable Zellen), weshalb die Zellen zur Proliferationsmessung durch [^3H]-Thymidin-Assay und zur Analyse der CAT-1-Expression auf Protein- und mRNA-Ebene isoliert werden konnten. DMSO zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Viabilität der HG3-Zellen.

5.4.2 Die Inhibition des BZR-Signalwegs reduziert die Proliferation der CLL-Zelllinie HG3

Die Messung der Proliferation der HG3-Zellen bei Inkubation mit dem BTK-Inhibitor erfolgte wiederum durch einen [^3H]-Thymidin-Assay. Dafür wurden HG3-Zellen über 48 und 96 Stunden in der An- oder Abwesenheit des BTK-Inhibitors (5 μM , 10 μM) inkubiert. Dabei wurde die Kontrollbedingung der unbehandelten Zellen gleich 100 % gesetzt (entspricht 256109 ± 41160 cpm nach 48 h und 228521 ± 29609 cpm nach 96 h). Nach 48 Stunden Inkubation zeigte sich im Vergleich zur DMSO-Kontrolle eine signifikante Reduktion der Proliferation der HG3-Zellen, die durch eine Dosiserhöhung von 5 μM auf 10 μM noch einmal verstärkt werden konnte (Abnahme bei 5 μM BTK-Inhibitor: $48,9 \pm 18,8$ %, Abnahme bei 10 μM BTK-Inhibitor: $78,3 \pm 25,0$ %) (Abbildung 16A). Bei 96-stündiger Inkubation der HG3-Zellen mit 5 μM BTK-Inhibitor war kein Einfluss auf die Proliferation zu detektieren, während die Inkubation mit 10 μM BTK-Inhibitor zu einer signifikanten Proliferationshemmung führte (Abnahme: $62,3 \pm 34,1$ %) (Abbildung 16B), die jedoch weniger stark als nach 48 Stunden ausfiel.

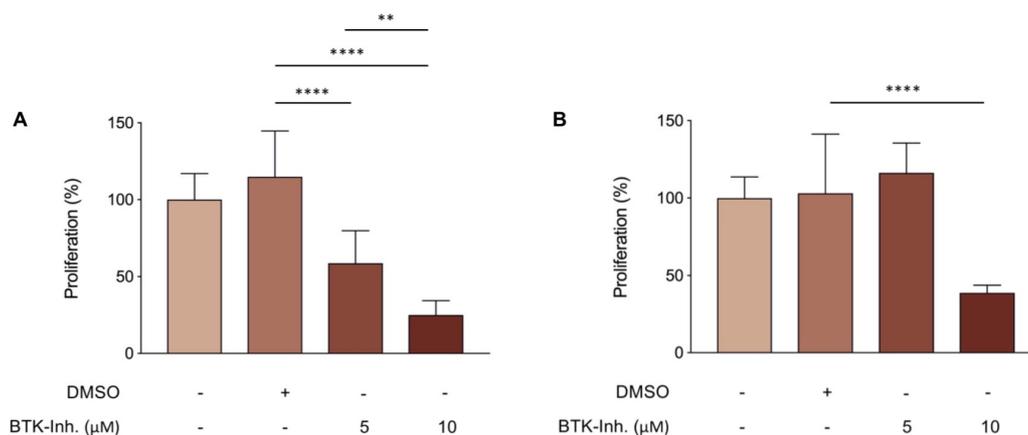


Abbildung 16: Die Proliferation der CLL-Zelllinie HG3 wird durch den BTK-Inhibitor gehemmt.

HG3-Zellen wurden über 48 und 96 h in der An- oder Abwesenheit von 5 μM , 10 μM BTK-Inhibitor oder 0,2 % DMSO als Kontrolle inkubiert. Die Proliferation wurde anschließend durch den Einbau von [^3H]-Thymidin über 16 h ermittelt. Gezeigt ist die quantitative Messung der Proliferation bei Inkubation mit dem BTK-Inhibitor nach A) 48 h und B) 96 h (Mittelwerte \pm Standardabweichungen, $n = 3$ unabhängige Versuche). Die statistische Auswertung erfolgte mit One-way-Anova und anschließendem Tukey-Test. Es wurden jeweils die Zellen, welche in der Gegenwart des BTK-Inhibitors inkubiert wurden, mit der DMSO-Kontrolle verglichen. Zum Vergleich der einzelnen Bedingungen wurde dabei jeweils die Kontrollbedingung der unbehandelten Zellen gleich 100 % gesetzt (entspricht 256109 ± 41160 cpm nach 48 h und 228521 ± 29609 cpm nach 96 h) (****: $p \leq 0,0001$; **: $p \leq 0,01$).

Der BTK-Inhibitor (5 μM , 10 μM) führte zu einer signifikanten Hemmung der Proliferation der HG3-Zellen. Eine Dosiserhöhung des Inhibitors von 5 μM auf 10 μM konnte die Proliferationshemmung sowohl nach 48 als auch nach 96 Stunden Inkubation weiter verstärken. DMSO zeigte keinen Einfluss auf die Proliferation der HG3-Zellen.

5.4.3 Die Inhibition des BZR-Signalwegs reduziert die Stoffwechselaktivität der CLL-Zelllinie HG3

Bei Inkubation der HG3-Zellen mit dem BTK-Inhibitor zeigte sich kein Einfluss auf die Viabilität der Zellen (Kapitel 5.4.1), während die Proliferation gleichzeitig stark gehemmt wurde (Kapitel 5.4.2). Um diesen Effekt in den HG3-Zellen genauer zu untersuchen, wurde zur Quantifizierung der Stoffwechselaktivität ein MTT-Assay durchgeführt. Der MTT-Assay erlaubt durch die enzymatische, NAD(P)H-abhängige Umwandlung eines Farbstoffs einen Rückschluss auf die metabolische Aktivität der Zellen. Die HG3-Zellen wurden dafür 48 und 96 Stunden mit dem BTK-Inhibitor inkubiert. Sowohl nach 48- (Abbildung 17A) als auch nach 96-stündiger (Abbildung 17B) Inkubation der Zellen mit dem BTK-Inhibitor zeigte sich eine signifikante Abnahme der Stoffwechselaktivität (Abnahme nach 48 h bei 10 μM BTK-Inhibitor: $35,4 \pm 7,5$ %, Abnahme nach 96 h bei 10 μM BTK-Inhibitor: $55,2 \pm 15,3$ %). Eine Dosiserhöhung des BTK-Inhibitors führt nach 96 Stunden Inkubation zu einer verstärkten Hemmung der metabolischen Aktivität.

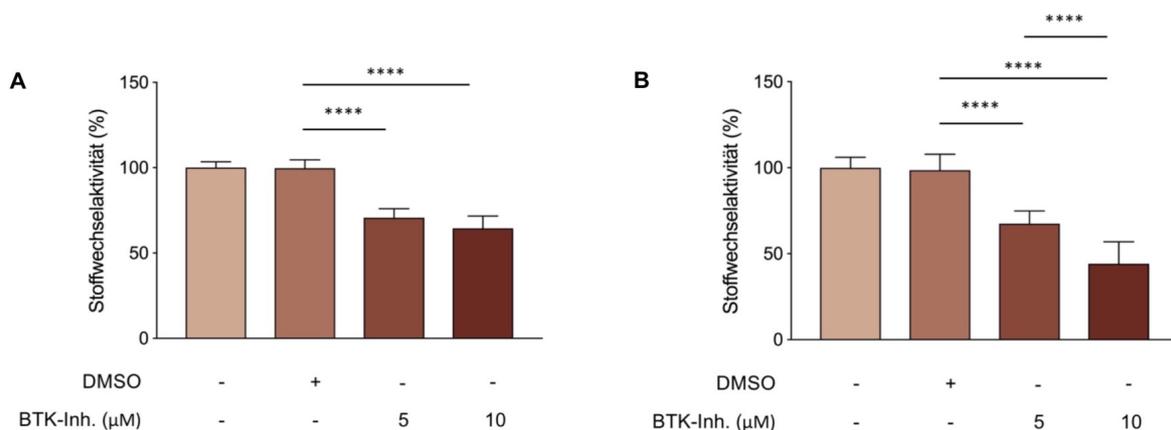


Abbildung 17: Die Stoffwechselaktivität der CLL-Zelllinie HG3 wird durch den BTK-Inhibitor gehemmt.

HG3-Zellen wurden über 48 und 96 h in der An- oder Abwesenheit von 5 μM , 10 μM BTK-Inhibitor oder 0,2 % DMSO als Kontrolle inkubiert. Die metabolische Aktivität wurde anschließend mittels MTT-Assay analysiert. Gezeigt ist die quantitative Messung der Stoffwechselaktivität nach A) 48 h und B) 96 h (Mittelwerte \pm Standardabweichungen, $n = 3$ unabhängige Versuche). Die statistische Auswertung erfolgte mit One-way-Anova und anschließendem Tukey-Test. Es wurden jeweils die Zellen, welche in der Gegenwart des BTK-Inhibitors inkubiert wurden, mit der DMSO-Kontrolle verglichen. Zum Vergleich der einzelnen Bedingungen wurde dabei jeweils die Kontrollbedingung der unbehandelten Zellen gleich 100 % gesetzt (****: $p \leq 0,0001$).

5.4.4 Die Inhibition des BZR-Signalwegs reduziert die CAT-1-Proteinexpression der CLL-Zelllinie HG3

Der BZR-Signalweg spielt eine wesentliche Rolle bei der Entstehung und Proliferation der CLL (Kapitel 2.4.3). Vor allem über die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs liegt auch eine Regulation der Proteinbiosynthese nahe.

Zur Untersuchung der CAT-1-Proteinexpression wurden die HG3-Zellen wiederum für 48 und 96 Stunden mit dem BTK-Inhibitor (5 μ M, 10 μ M) inkubiert. Zur Messung der Proteinexpression wurde dazu eine SDS-PAGE mit anschließender Western Blot-Analyse durchgeführt. Eine suffiziente Kontrolle der Inhibition des B-Zell-Rezeptor-Signalwegs wurde im Western Blot durch die Phosphorylierung von pPLC γ 2 überprüft. Nach 48-stündiger Inkubation der HG3-Zellen mit dem BTK-Inhibitor zeigte sich im Vergleich zur DMSO-Kontrolle eine signifikante Reduktion der CAT-1-Expression um $37,8 \pm 7,2$ % bei 5 μ M BTK-Inhibitor und um $38,6 \pm 12,9$ % bei 10 μ M BTK-Inhibitor (Abbildung 18A). Eine wirksame Inhibition des Signalwegs wurde durch die signifikante Reduktion der pPLC γ 2-Expression bestätigt (Abbildung 18B). Bei einer Inkubation der HG3-Zellen mit dem BTK-Inhibitor über 96 Stunden kam es weiterhin zu einer signifikanten Reduktion der CAT-1-Expression (Abnahme bei 5 μ M BTK-Inhibitor: $36,0 \pm 8,5$ %, Abnahme bei 10 μ M BTK-Inhibitor: $39,3 \pm 9,7$ %) (Abbildung 18C). Zudem zeigte sich eine verminderte Expression der pPLC γ 2 nach 96 Stunden Inkubation mit dem BTK-Inhibitor (Abbildung 18D). DMSO zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Proteinexpression von CAT-1 und pPLC γ 2.

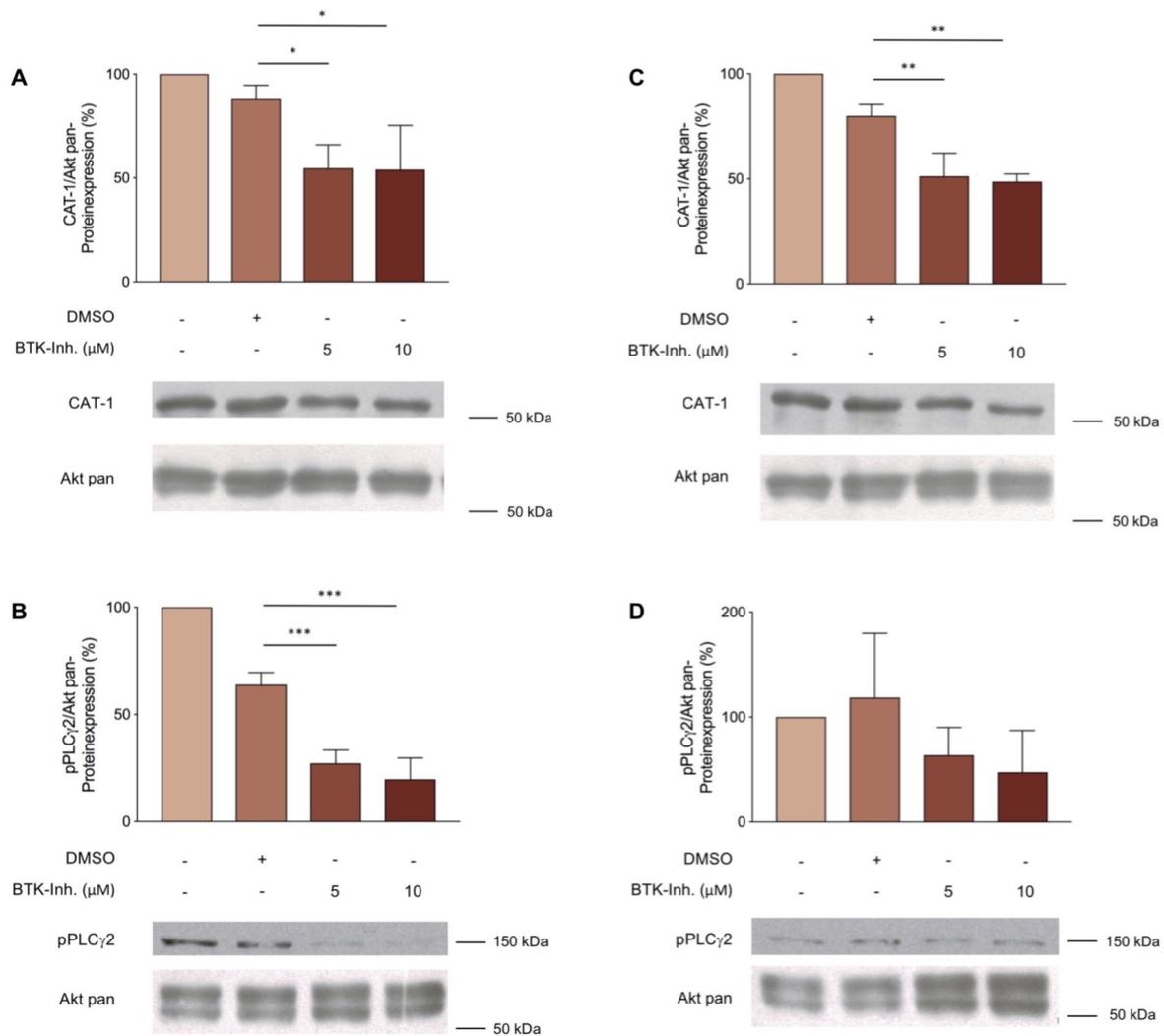


Abbildung 18: Die CAT-1-Proteinexpression der CLL-Zelllinie HG3 wird durch den BTK-Inhibitor gehemmt. HG3-Zellen wurden über 48 und 96 h in der An- oder Abwesenheit von 5 μM , 10 μM BTK-Inhibitor oder 0,2 % DMSO als Kontrolle inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Proteinexpression von CAT-1 und pPLC γ 2 relativ zur Akt-Expression (als Ladekontrolle) im Western Blot ermittelt. Gezeigt ist die quantitative Messung der A) CAT-1-Expression nach 48 h, B) pPLC γ 2-Expression nach 48 h, C) CAT-1-Expression nach 96 h, D) pPLC γ 2-Expression nach 96 h (Mittelwerte \pm Standardabweichungen, $n = 3$ unabhängige Versuche). Die statistische Auswertung erfolgte mit One-way-Anova und anschließendem Tukey-Test. Es wurden jeweils die Zellen, welche in der Gegenwart des BTK-Inhibitors inkubiert wurden, mit der DMSO-Kontrolle verglichen. Zum Vergleich der einzelnen Bedingungen wurde dabei jeweils die Kontrollbedingung der unbehandelten Zellen gleich 100 % gesetzt (***: $p \leq 0,001$; **: $p \leq 0,01$; *: $p \leq 0,05$). Repräsentative Western Blot-Analysen für CAT-1 (55 kDa), pPLC γ 2 (150 kDa) und Akt pan (60 kDa).

5.4.5 Die Inhibition des BZR-Signalwegs zeigt keinen Einfluss auf die CAT-1-mRNA-Expression der CLL-Zelllinie HG3

Zur Quantifizierung der CAT-1-mRNA-Expression wurde wiederum eine qRT-PCR durchgeführt. Dazu wurden die HG3-Zellen wie bereits bei den Versuchen mit dem Akt-Inhibitor für 6 und 24 Stunden mit dem BTK-Inhibitor inkubiert.

Sowohl nach 6- (Abbildung 19A) als auch nach 24-stündiger (Abbildung 19B) Inkubation der HG3-Zellen zeigte sich kein signifikanter Einfluss des BTK-Inhibitors auf die CAT-1-mRNA-Expression.

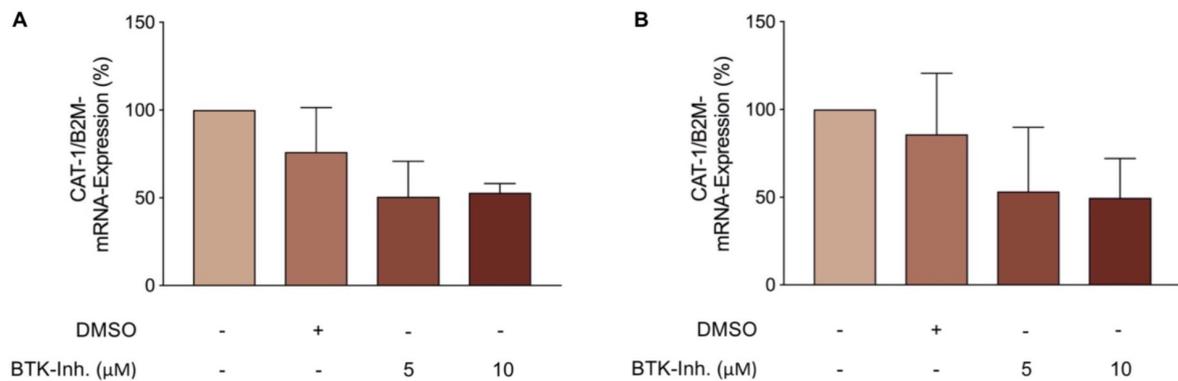


Abbildung 19: Der BTK-Inhibitor zeigt keinen Einfluss auf die CAT-1-mRNA-Expression der CLL-Zelllinie HG3.

HG3-Zellen wurden über 6 und 24 h in der An- oder Abwesenheit von 5 µM, 10 µM BTK-Inhibitor oder 0,2 % DMSO als Kontrolle inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die mRNA-Expression von CAT-1 relativ zur B2M-Expression (als Ladekontrolle) in der qRT-PCR ermittelt. Gezeigt ist die quantitative Messung der A) CAT-1-Expression nach 6 h, B) CAT-1-Expression nach 24 h (Mittelwerte \pm Standardabweichungen, $n = 3$ unabhängige Versuche). Die statistische Auswertung erfolgte mit One-way-Anova und anschließendem Tukey-Test. Es wurden jeweils die Zellen, welche in der Gegenwart des BTK-Inhibitors inkubiert wurden, mit der DMSO-Kontrolle verglichen. Zum Vergleich der einzelnen Bedingungen wurde dabei jeweils die Kontrollbedingung der unbehandelten Zellen gleich 100 % gesetzt.

5.5 Analyse der Effekte des NF- κ B-Inhibitors auf die CAT-1-Expression der CLL-Zelllinie HG3

Der NF- κ B-Signalweg stellt einen weiteren zentralen Signalweg zur Regulation der Proliferation und Apoptose in CLL-Zellen dar (Kapitel 2.4.2).

Der in den folgenden Experimenten verwendete NF- κ B-Inhibitor Bay 11-7082 hemmt die Phosphorylierung von I κ B α , wodurch pI κ B α nicht ubiquitiniert und proteasomal abgebaut wird. In der Folge können die NF- κ B-Proteine nicht durch Dimerisierung die Transkription verschiedener Gene im Zellkern aktivieren.

5.5.1 Die Inhibition des NF- κ B-Signalwegs reduziert die Viabilität der CLL-Zelllinie HG3

Zur durchflusszytometrischen Messung der Viabilität wurden die HG3-Zellen für 6, 24, 48 und 96 Stunden mit dem NF- κ B-Inhibitor in RPMI-Medium inkubiert. Aufgrund der in Vorversuchen beobachteten, schlechten Viabilität der unbehandelten Kontrollzellen wurde das Medium aller Versuchsbedingungen nach 48 Stunden erneuert.

Zu Beginn der Versuche mit dem NF- κ B-Inhibitor wurden ebenfalls Dosisfindungsversuche durchgeführt (1 μ M, 2 μ M, 5 μ M, 7,5 μ M und 10 μ M). Wie bei den Versuchen mit dem Akt- und BTK-Inhibitor wurde eine Konzentration des Inhibitors ermittelt, welche den Signalweg effektiv inhibiert, gleichzeitig jedoch ausreichend viable Zellen (> 70 %) nach der Inkubationszeit für die weiteren Analysen ermöglicht. Dies war bei Konzentrationen von 5 μ M und 7,5 μ M NF κ B-Inhibitor gegeben. Da der NF- κ B-Inhibitor ebenfalls in DMSO gelöst vorlag, wurde dem Versuchsansatz erneut eine DMSO-Kontrolle entsprechend der maximal eingesetzten DMSO-Menge (hier 0,75 % DMSO = 7,5 μ l/ml) hinzugefügt.

Nach 6 Stunden Inkubation der HG3-Zellen mit dem NF- κ B-Inhibitor zeigte sich kein Anstieg frühapoptotischer Zellen (Abbildung 20A), jedoch eine Zunahme toter Zellen (Zunahme bei 7,5 μ M NF κ B-Inhibitor: 9,1 \pm 2,9 %) (Abbildung 20B). Bei einer längeren Inkubation über 24 Stunden kam es sowohl zu einem Anstieg frühapoptotischer (Zunahme bei 7,5 μ M NF κ B-Inhibitor: 19,4 \pm 5,0 %) (Abbildung 20C) als auch toter Zellen (Zunahme bei 7,5 μ M NF κ B-Inhibitor: 13,0 \pm 2,3 %) (Abbildung 22D). Dieser Effekt war auch nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden zu beobachten (Abbildung 20E, 20F). Nach 96 Stunden Inkubation der HG3-Zellen mit 7,5 μ M NF κ B-Inhibitor kam es zu einer signifikanten Zunahme frühapoptotischer Zellen (Zunahme: 13,3 \pm

4,4 %) (Abbildung 20G), während der Anteil toter Zellen bei Inkubation mit dem Inhibitor tendenziell eher abnahm (Abbildung 20H).

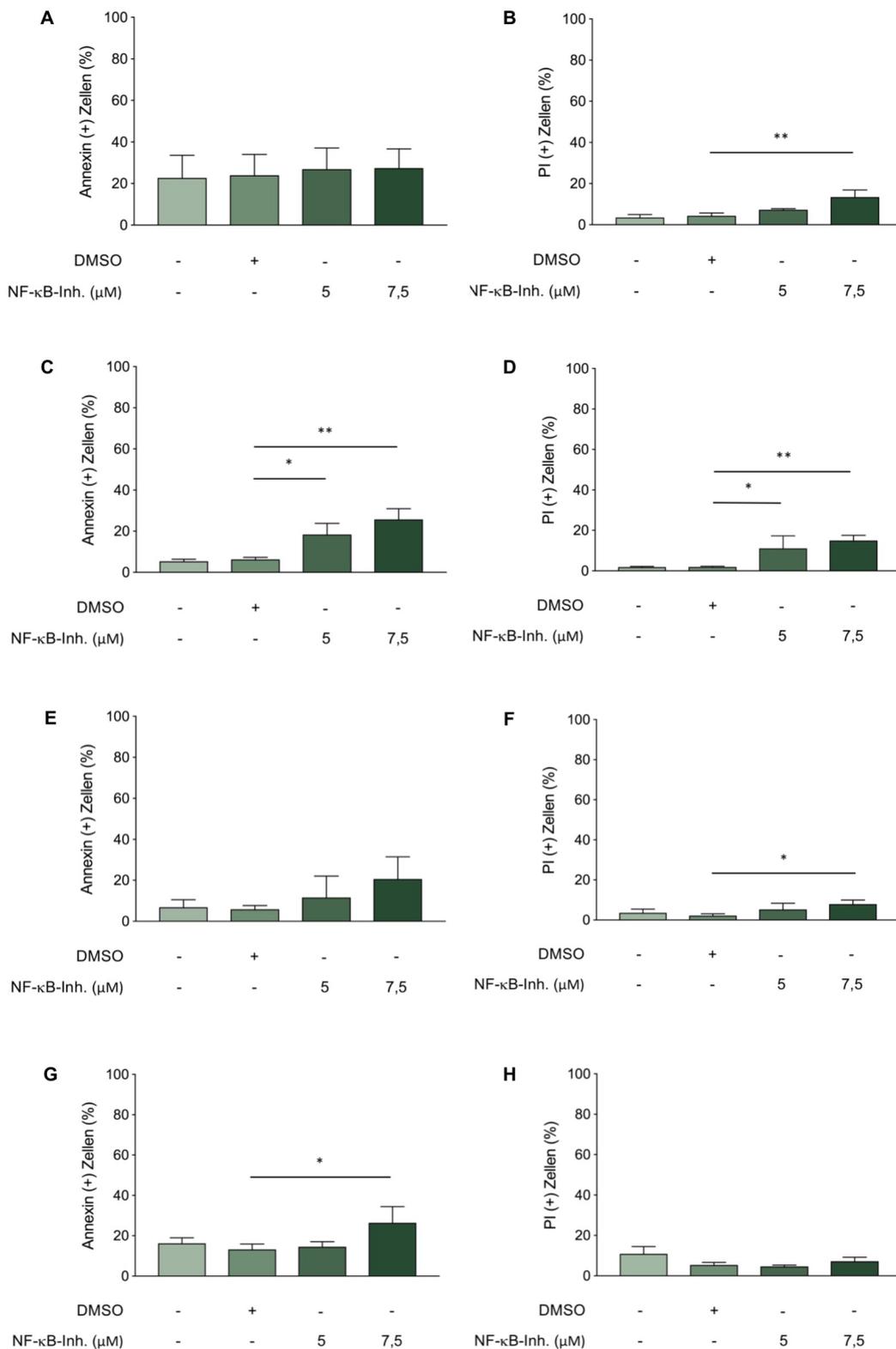


Abbildung 20: Die Viabilität der CLL-Zelllinie HG3 wird durch den NF-κB-Inhibitor gehemmt.

HG3-Zellen wurden über 6, 24, 48 und 96 h in der An- oder Abwesenheit von 5 μM, 7,5 μM NF-κB-Inhibitor oder 0,75 % DMSO als Kontrolle inkubiert. Anschließend wurden die frühe Apoptose bzw. der Zelltod der Zellen nach A,B) 6, C,D) 24, E,F) 48 und G,H) 96 h durch die durchflusszytometrische Messung von A,C,E,G) Annexin-V- und B,D,F,H) Propidiumiodid-positiver Zellen festgestellt (Mittelwerte ± Standardabweichungen, n = 3 unabhängige Versuche). Die statistische Auswertung erfolgte mit One-way-Anova und anschließendem Tukey-Test. Es wurden jeweils die Zellen, welche in der Gegenwart des NF-κB-Inhibitors inkubiert wurden, mit der DMSO-Kontrolle verglichen (**: p ≤ 0,01; *: p ≤ 0,05).

Die HG3-Zellen zeigten bei Inkubation mit dem NF- κ B-Inhibitor (5 μ M, 7,5 μ M) zu allen Zeitpunkten eine ausreichende Viabilität (mindestens: 85,0 \pm 2,1 % viable Zellen), weshalb die Zellen zur Proliferationsmessung durch [3 H]-Thymidin-Assay und zur Analyse der CAT-1-Expression auf Protein- und mRNA-Ebene isoliert werden konnten. DMSO zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Viabilität der HG3-Zellen.

5.5.2 Die Inhibition des NF- κ B-Signalwegs reduziert die Proliferation der CLL-Zelllinie HG3

Die Messung der Proliferation der HG3-Zellen bei Inkubation mit dem NF- κ B-Inhibitor erfolgte durch einen [3 H]-Thymidin-Assay. Dafür wurden HG3-Zellen über 48 und 96 Stunden in der An- oder Abwesenheit des NF- κ B-Inhibitors (5 μ M, 7,5 μ M) inkubiert. Dabei wurde die Kontrollbedingung der unbehandelten Zellen gleich 100 % gesetzt (entspricht 258093 \pm 38457 cpm nach 48 h und 273307 \pm 69844 cpm nach 96 h). Nach 48-stündiger Inkubation zeigte sich eine signifikante Reduktion der Proliferation der HG3-Zellen (Abnahme bei 5 μ M NF- κ B-Inhibitor: 88,6 \pm 12,7 %, Abnahme bei 7,5 μ M NF- κ B-Inhibitor: 99,9 \pm 15,4 %) (Abbildung 21A). Bei einer längeren Inkubationszeit über 96 Stunden wurde diese Proliferationshemmung weiter verstärkt und es kam zu einer vollständigen Suppression der Proliferation der HG3-Zellen (Abnahme bei 7,5 μ M NF- κ B-Inhibitor: 99,9 \pm 27,6 %) (Abbildung 21B).

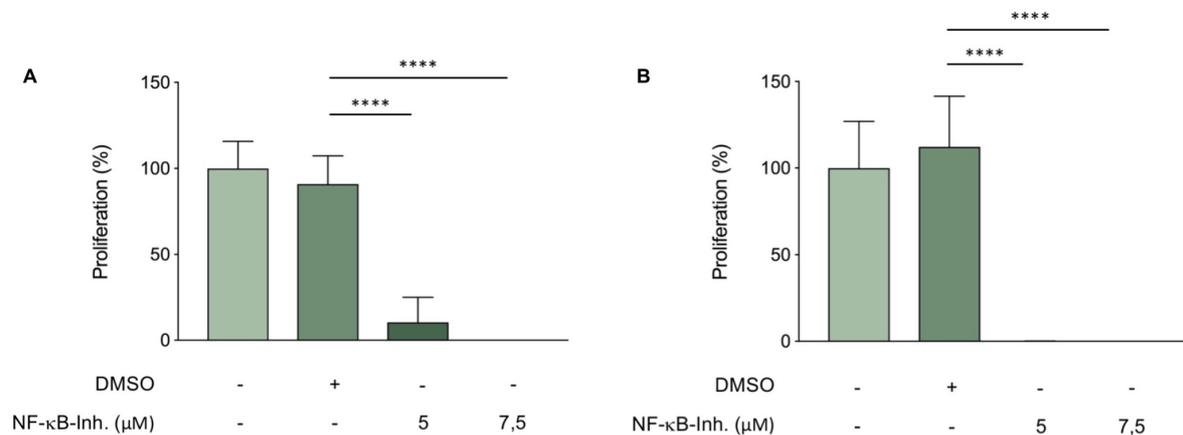


Abbildung 21: Die Proliferation der CLL-Zelllinie HG3 wird durch den NF- κ B-Inhibitor gehemmt.

HG3-Zellen wurden über 48 und 96 h in der An- oder Abwesenheit von 5 μ M, 7,5 μ M NF- κ B-Inhibitor oder 0,75 % DMSO als Kontrolle inkubiert. Die Proliferation wurde anschließend durch den Einbau von [3 H]-Thymidin über 16 h ermittelt. Gezeigt ist die quantitative Messung der Proliferation bei Inkubation mit dem NF- κ B-Inhibitor nach A) 48 h und B) 96 h (Mittelwerte \pm Standardabweichungen, n = 3 unabhängige Versuche). Die statistische Auswertung erfolgte mit One-way-Anova und anschließendem Tukey-Test. Es wurden jeweils die Zellen, welche in der Gegenwart des NF- κ B-Inhibitors inkubiert wurden, mit der DMSO-Kontrolle verglichen. Zum Vergleich der einzelnen Bedingungen wurde dabei jeweils die Kontrollbedingung der unbehandelten Zellen gleich 100 % gesetzt (entspricht 258093 \pm 38457 cpm nach 48 h und 273307 \pm 69844 cpm nach 96 h) (****: p \leq 0,0001).

Der NF- κ B-Inhibitor (5 μ M, 7,5 μ M) führte zu einer signifikanten Hemmung der Proliferation der HG3-Zellen. Eine Dosiserhöhung konnte die Proliferationshemmung weiter verstärken, was nach 96 Stunden Inkubation zu einer vollständigen Suppression der Proliferation führte. DMSO zeigte sowohl nach 48 als auch nach 96 Stunden Inkubation keinen Einfluss auf die Proliferation der HG3-Zellen.

5.5.3 Die Inhibition des NF- κ B-Signalwegs reduziert die Stoffwechselaktivität der CLL-Zelllinie HG3

Bei Inkubation der HG3-Zellen mit dem NF- κ B-Inhibitor zeigte sich nur eine leichte Reduktion viabler Zellen (Kapitel 5.5.1), während gleichzeitig die Proliferation vollständig gehemmt wurde (Kapitel 5.5.2). Um diesen Effekt in den HG3-Zellen genauer zu untersuchen, wurde zur Quantifizierung der Stoffwechselaktivität erneut ein MTT-Assay durchgeführt. Die HG3-Zellen wurden dafür 48 und 96 Stunden mit dem NF- κ B-Inhibitor inkubiert.

Sowohl nach 48 (Abbildung 22A) als auch nach 96 Stunden (Abbildung 22B) Inkubation der Zellen mit dem NF- κ B-Inhibitor zeigte sich eine signifikante Abnahme der Stoffwechselaktivität (Abnahme nach 48 h bei 7,5 μ M NF- κ B-Inhibitor: $48,0 \pm 25,6$ %, Abnahme nach 96 h bei 7,5 μ M NF- κ B-Inhibitor: $87,6 \pm 5,8$ %). Eine Dosiserhöhung des NF- κ B-Inhibitors führte zudem nach 96 Stunden Inkubation zu einer stärkeren Hemmung der metabolischen Aktivität.

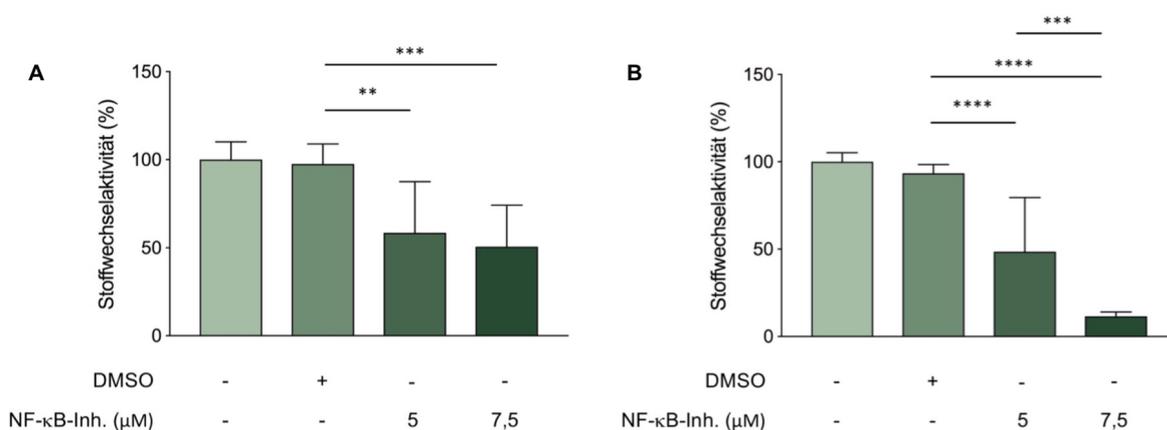


Abbildung 22: Die Stoffwechselaktivität der CLL-Zelllinie HG3 wird durch den NF- κ B-Inhibitor gehemmt.

HG3-Zellen wurden über 48 und 96 h in der An- oder Abwesenheit von 5 μ M, 7,5 μ M NF- κ B-Inhibitor oder 0,75 % DMSO als Kontrolle inkubiert. Die metabolische Aktivität wurde anschließend mittels MTT-Assay analysiert. Gezeigt ist die quantitative Messung der Stoffwechselaktivität nach A) 48 h und B) 96 h (Mittelwerte \pm Standardabweichungen, $n = 3$ unabhängige Versuche). Die statistische Auswertung erfolgte mit One-way-Anova und anschließendem Tukey-Test. Es wurden jeweils die Zellen, welche in der Gegenwart des NF- κ B-Inhibitors inkubiert wurden, mit der DMSO-Kontrolle verglichen. Zum Vergleich der einzelnen Bedingungen wurde dabei jeweils die Kontrollbedingung der unbehandelten Zellen gleich 100 % gesetzt (****: $p \leq 0,0001$; ***: $p \leq 0,001$; **: $p \leq 0,01$).

5.5.4 Die Inhibition des NF- κ B-Signalwegs zeigt keinen Einfluss auf die CAT-1-Proteinexpression der CLL-Zelllinie HG3

Zur Untersuchung der CAT-1-Proteinexpression wurden die HG3-Zellen wie bei den Versuchen mit dem Akt- und BTK-Inhibitor für 48 und 96 Stunden mit dem NF- κ B-Inhibitor (5 μ M, 7,5 μ M) inkubiert. Zur Quantifizierung der CAT-1-Proteinexpression wurde eine SDS-PAGE mit anschließender Western Blot-Analyse durchgeführt. Eine suffiziente Kontrolle der Inhibition wurde bei den Versuchen mit dem NF- κ B-Inhibitor durch die starke Hemmung der Proliferation begründet (Kapitel 5.5.2).

Sowohl nach 48- (Abbildung 23A) als auch nach 96-stündiger (Abbildung 23B) Inkubation der HG3-Zellen mit dem NF- κ B-Inhibitor zeigte sich keine signifikante Reduktion der CAT-1-Proteinexpression im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Es wurde jedoch vor allem nach 48 Stunden eine deutliche Abnahme der CAT-1-Expression in der DMSO-Kontrolle (0,75 μ l/ml DMSO) relativ zur Kontrollbedingung der unbehandelten Zellen beobachtet.

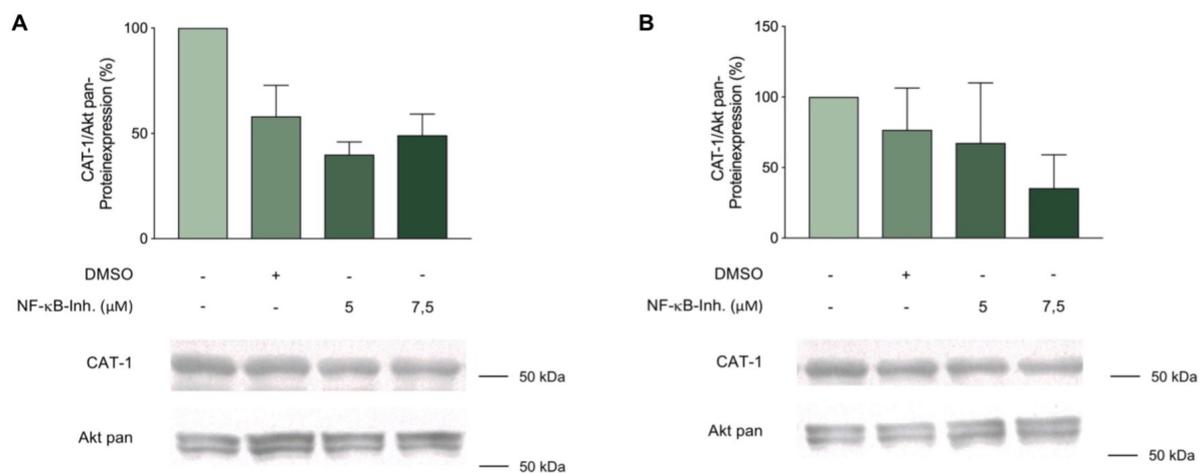


Abbildung 23: Der NF- κ B-Inhibitor zeigt keinen Einfluss auf die CAT-1-Proteinexpression der CLL-Zelllinie HG3. HG3-Zellen wurden über 48 und 96 h in der An- oder Abwesenheit von 5 μ M, 7,5 μ M NF- κ B-Inhibitor oder 0,75 % DMSO als Kontrolle inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Proteinexpression von CAT-1 relativ zur Akt-Expression (als Ladekontrolle) im Western Blot ermittelt. Gezeigt ist die quantitative Messung der A) CAT-1-Expression nach 48 h und B) CAT-1-Expression nach 96 h (Mittelwerte \pm Standardabweichungen, $n = 3$ unabhängige Versuche). Die statistische Auswertung erfolgte mit One-way-Anova und anschließendem Tukey-Test. Es wurden jeweils die Zellen, welche in der Gegenwart des NF- κ B-Inhibitors inkubiert wurden, mit der DMSO-Kontrolle verglichen. Zum Vergleich der einzelnen Bedingungen wurde dabei jeweils die Kontrollbedingung der unbehandelten Zellen gleich 100 % gesetzt. Repräsentative Western Blot-Analysen für CAT-1 (55 kDa) und Akt pan (60 kDa).

5.5.5 Die Inhibition des NF- κ B-Signalwegs zeigt keinen Einfluss auf die CAT-1-mRNA-Expression der CLL-Zelllinie HG3

Zur Quantifizierung der CAT-1-mRNA-Expression wurde eine qRT-PCR durchgeführt. Dazu wurden die HG3-Zellen wiederum für 6 und 24 Stunden mit dem NF- κ B-Inhibitor inkubiert.

Sowohl nach 6- (Abbildung 24A) als auch nach 24-stündiger (Abbildung 24B) Inkubation der HG3-Zellen mit dem Inhibitor zeigte sich kein signifikanter Einfluss auf die CAT-1-mRNA-Expression. Nach 6 Stunden Inkubation mit dem NF- κ B-Inhibitor ließ sich sogar eine verstärkte CAT-1-mRNA-Expression vermuten. Die DMSO-Kontrolle (0,75 μ l/ml DMSO) zeigte wiederum nach 6 und 24 Stunden eine leichte, jedoch nicht signifikante Abnahme der CAT-1-mRNA-Expression relativ zur Kontrollbedingung der unbehandelten Zellen.

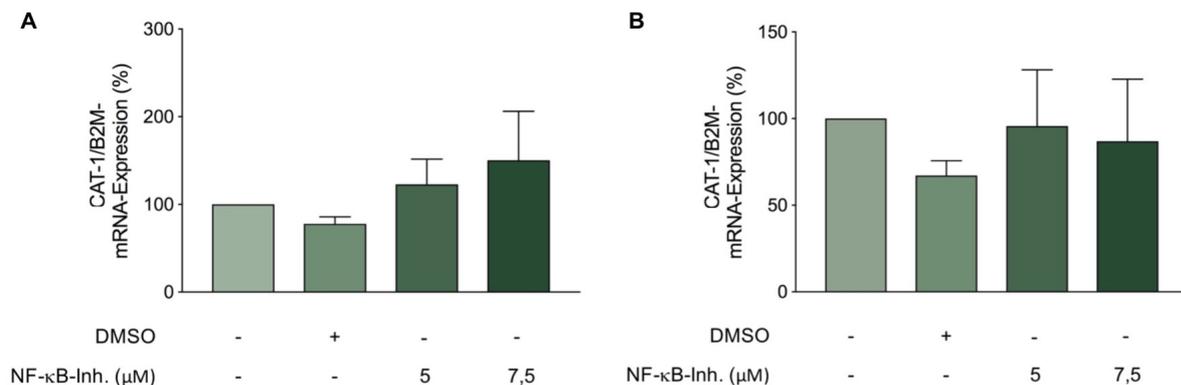


Abbildung 24: Der NF- κ B-Inhibitor zeigt keinen Einfluss auf die CAT-1-mRNA-Expression der CLL-Zelllinie HG3. HG3-Zellen wurden über 6 und 24 h in der An- oder Abwesenheit von 5 μ M bzw. 7,5 μ M NF- κ B-Inhibitor oder 0,75 % DMSO als Kontrolle inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die mRNA-Expression von CAT-1 relativ zur B2M-Expression (als Ladekontrolle) in der qRT-PCR ermittelt. Gezeigt ist die quantitative Messung der A) CAT-1-Expression nach 6 h und B) CAT-1-Expression nach 24 h (Mittelwerte \pm Standardabweichungen, n = 3 unabhängige Versuche). Die statistische Auswertung erfolgte mit One-way-Anova und anschließendem Tukey-Test. Es wurden jeweils die Zellen, welche in der Gegenwart des NF- κ B-Inhibitors inkubiert wurden, mit der DMSO-Kontrolle verglichen. Zum Vergleich der einzelnen Bedingungen wurde dabei jeweils die Kontrollbedingung der unbehandelten Zellen gleich 100 % gesetzt.

5.6 Analyse der CAT-1-Expression der CLL-Zelllinie HG3 bei Kombination der verschiedenen Inhibitoren

Nachdem die Rolle des PI3K/Akt-, BZR- und NF- κ B-Signalwegs in der Regulation der CAT-1-Expression in HG3-Zellen jeweils einzeln untersucht wurde (Kapitel 5.3, 5.4, 5.5), sollte im Folgenden der Einfluss einer Kombination der Inhibitoren auf die CAT-1-Expression analysiert werden. Sowohl der Akt- als auch der BTK-Inhibitor hatten eine signifikante Reduktion der CAT-1-Proteinexpression (Abnahme bei Inkubation der HG3-Zellen mit dem Akt-Inhibitor: bis zu $46,7 \pm 3,4$ %, Abnahme bei Inkubation der HG3-Zellen mit dem BTK-Inhibitor: bis zu $39,3 \pm 9,7$ %) nach 48 und 96 Stunden gezeigt, während bei Inkubation mit dem NF- κ B-Inhibitor kein Effekt auf die Expression des CAT-1 nachweisbar war.

Intrazellulär kommt es in CLL-Zellen zu zahlreichen Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Signalwegen, wobei die genauen Interaktionen und ihre Rolle im Zellwachstum, der Proliferation und der Viabilität der CLL-Zellen im Detail noch nicht vollständig verstanden sind (Kapitel 2.4).

Da die Inhibitoren wiederum in DMSO gelöst vorlagen, wurde dem Versuchsansatz eine DMSO-Kontrolle entsprechend der jeweils maximal eingesetzten DMSO-Menge hinzugefügt. Die HG3-Zellen wurden für 24 und 48 Stunden mit den Inhibitoren inkubiert, da sich in Vorversuchen sowohl nach 6 Stunden (zusätzlich durch die Aufbereitung der Zellen) als auch nach 96 Stunden (zusätzlich durch die lange Inkubationszeit) durch die Kombination der Inhibitoren eine deutliche Reduktion viabler Zellen (< 70 %) zeigte.

5.6.1 Analyse der CAT-1-Expression der CLL-Zelllinie HG3 bei Kombination des Akt- und BTK-Inhibitors

Zunächst wurden die HG3-Zellen mit einer Kombination des Akt- und BTK-Inhibitors inkubiert. Sowohl bei den Versuchen mit dem Akt-Inhibitor als auch bei den Versuchen mit dem BTK-Inhibitor hatte sich eine signifikante Reduktion der CAT-1-Proteinexpression gezeigt (Kapitel 5.3.3, 5.4.3).

5.6.1.1 Die simultane Inhibition des PI3K/Akt- und BTK-Signalwegs reduziert die Viabilität der CLL-Zelllinie HG3

Zur durchflusszytometrischen Messung der Viabilität wurden die HG3-Zellen für 24 und 48 Stunden mit dem Akt- und BTK-Inhibitor in RPMI-Medium inkubiert. Die Inhibitoren wurden in den Dosierungen der Einzelversuche eingesetzt (Kapitel 5.3, Kapitel 5.4). Die DMSO-Kontrolle entsprach der maximal eingesetzten DMSO-Menge (hier 0,4 % DMSO = 4 μ l/ml).

Nach 24-stündiger Inkubation der HG3-Zellen führte vor allem die Inkubation mit 10 μ M Akt-Inhibitor zu einer signifikanten Zunahme frühapoptotischer (Zunahme: $9,5 \pm 3,0$ %) und toter Zellen (Zunahme: $4,53 \pm 0,2$ %), während der BTK-Inhibitor keinen Einfluss auf die Viabilität der HG3-Zellen zeigte. Durch die Kombination der beiden Inhibitoren kam es jedoch im Vergleich zur Inkubation mit dem Akt-Inhibitor zu einem weiteren Anstieg frühapoptotischer (Zunahme bei 10 μ M Akt-Inhibitor und 10 μ M BTK-Inhibitor: bis zu $20,4 \pm 3,0$ %) und toter Zellen (Zunahme bei 10 μ M Akt-Inhibitor und 10 μ M BTK-Inhibitor: bis zu $15,6 \pm 2,5$ %). Eine deutliche Reduktion der Viabilität zeigte sich auch nach 48-stündiger Inkubation (Abbildung 25C, 25D). Im Vergleich zur 24-stündigen Inkubation kam es dabei zu einem weiteren Anstieg der frühapoptotischen (Zunahme bei 10 μ M Akt-Inhibitor und 10 μ M BTK-Inhibitor: bis zu $42,7 \pm 10,4$ %) und toten Zellen (Zunahme bei 10 μ M Akt-Inhibitor und 10 μ M BTK-Inhibitor: bis zu $22,6 \pm 7,9$ %). DMSO zeigte keinen Einfluss auf die Viabilität der HG3-Zellen.

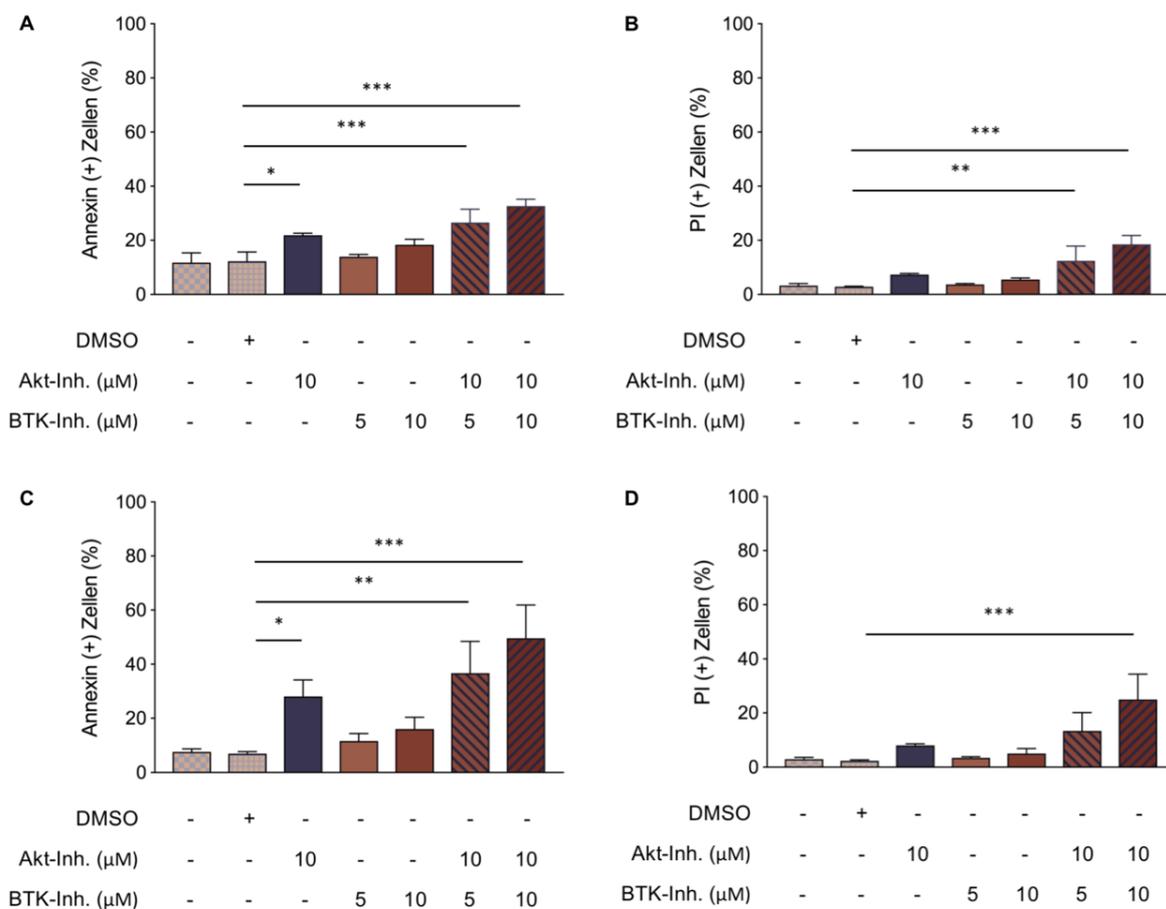


Abbildung 25: Die Viabilität der CLL-Zelllinie HG3 wird durch die Kombination des Akt- und BTK-Inhibitors gehemmt. HG3-Zellen wurden über 24 und 48 h in der An- oder Abwesenheit von 10 μM Akt-Inhibitor, 5 μM bzw. 10 μM BTK-Inhibitor oder 0,4 % DMSO als Kontrolle inkubiert. Anschließend wurde die Viabilität der Zellen nach A,B) 24 und C,D) 48 h durch die durchflusszytometrische Messung von A,C) Annexin-V- und B,D) Propidiumiodid-positiver Zellen festgestellt (Mittelwerte ± Standardabweichungen, n = 3 unabhängige Versuche). Die statistische Auswertung erfolgte mit One-way-Anova und anschließendem Tukey-Test. Es wurden jeweils die Zellen, welche in der Gegenwart des Akt- oder BTK-Inhibitors inkubiert wurden, mit der DMSO-Kontrolle verglichen (***: p ≤ 0,001; **: p ≤ 0,01; *: p ≤ 0,05).

Die HG3-Zellen zeigten bei Inkubation mit dem Akt- (10 μM) und BTK-Inhibitor (5 μM, 10 μM) eine ausreichende Viabilität (mindestens 75,0 ± 7,7 % viable Zellen), weshalb die Zellen zur Proliferationsmessung durch [³H]-Thymidin-Assay und zur Analyse der CAT-1-Expression auf Protein- und mRNA-Ebene isoliert werden konnten.

5.6.1.2 Die simultane Inhibition des PI3K/Akt- und BZR-Signalwegs reduziert die Proliferation der CLL-Zelllinie HG3

Die Messung der Proliferation der HG3-Zellen bei Inkubation mit dem Akt- und BTK-Inhibitor erfolgte wiederum durch einen [³H]-Thymidin-Assay. Dazu wurden die Zellen für 48 Stunden mit den Inhibitoren inkubiert. Die Kontrollbedingung der unbehandelten Zellen wurde gleich 100 % gesetzt (entspricht 366189 ± 90834 cpm).

Nach 48 Stunden Inkubation der Zellen zeigte sich eine signifikante Abnahme der Proliferation bei Inkubation mit 10 μM Akt-Inhibitor (94,0 ± 15,0 %). Bei Inkubation mit

dem BTK-Inhibitor zeigte sich ebenfalls eine dosisabhängige Reduktion der Proliferation (Abnahme bei 5 μM : $48,1 \pm 16,1$ %, Abnahme bei 10 μM : $80,4 \pm 13,8$ %). Durch die Kombination der Inhibitoren konnte die Proliferationshemmung nochmals verstärkt werden (Abnahme bei 10 μM Akt-Inhibitor + bei 10 μM BTK-Inhibitor: bis zu $99,3 \pm 13,6$ %), wodurch eine vollständig aufgehobene Proliferation gemessen werden konnte (Abbildung 26). DMSO zeigte keinen Einfluss auf die Proliferation der HG3-Zellen.

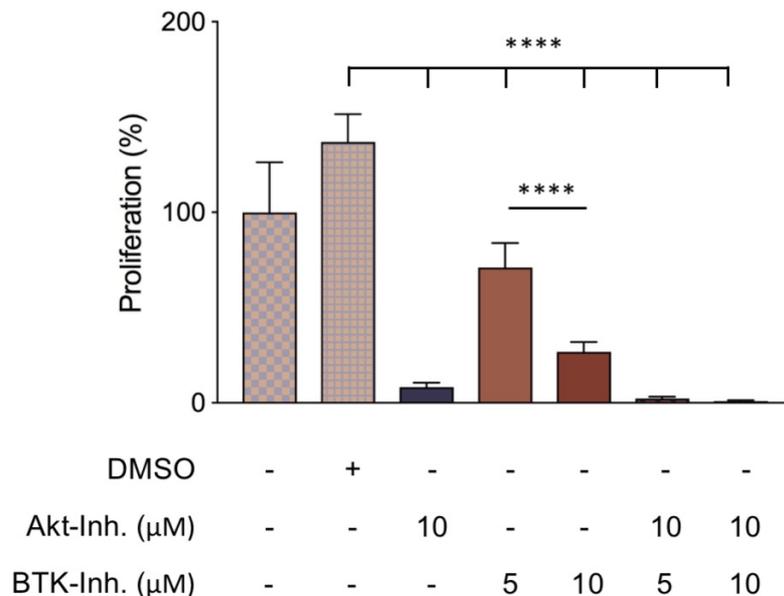


Abbildung 26: Die Proliferation der CLL-Zelllinie HG3 wird durch die Kombination des Akt- und BTK-Inhibitors gehemmt. HG3-Zellen wurden über 48 h in der An- oder Abwesenheit von 10 μM Akt-Inhibitor, 5 μM bzw. 10 μM BTK-Inhibitor oder 0,4 % DMSO als Kontrolle inkubiert. Die Proliferation wurde anschließend durch den Einbau von [^3H]-Thymidin über 16 h ermittelt. Gezeigt ist die quantitative Messung der Proliferation bei Inkubation mit dem Akt- und BTK-Inhibitor nach 48 h (Mittelwerte \pm Standardabweichungen, $n = 3$ unabhängige Versuche). Die statistische Auswertung erfolgte mit One-way-Anova und anschließendem Tukey-Test. Es wurden jeweils die Zellen, welche in der Gegenwart des Akt- und BTK-Inhibitors inkubiert wurden, mit der DMSO-Kontrolle verglichen. Zum Vergleich der einzelnen Bedingungen wurde dabei jeweils die Kontrollbedingung der unbehandelten Zellen gleich 100 % gesetzt (entspricht 366189 ± 90834 cpm) (****: $p \leq 0,0001$).

5.6.1.3 Die simultane Inhibition des PI3K/Akt- und BZR-Signalwegs zeigt keinen Einfluss auf die CAT-1-Proteinexpression der CLL-Zelllinie HG3

Zur Untersuchung der CAT-1-Proteinexpression wurden die HG3-Zellen für 48 Stunden mit dem Akt- (10 μM) und BTK-Inhibitor (5 μM , 10 μM) inkubiert. Zur Messung der Proteinexpression wurde dazu eine SDS-PAGE mit anschließender Western Blot-Analyse durchgeführt. Eine suffiziente Kontrolle der Signalwege wurde im Western Blot durch die Phosphorylierungen von pAkt (Ser473), pAkt (Thr308) und pPLC $\gamma 2$ überprüft. Die DMSO-Kontrolle entsprach der maximal eingesetzten DMSO-Menge (hier 0,4 % DMSO = 4 $\mu\text{l/ml}$).

Nach 48 Stunden Inkubation der HG3-Zellen mit den Inhibitoren zeigte sich tendenziell eine leichte, jedoch nicht signifikante Abnahme der CAT-1-Proteinexpression (Abbildung 27A). Der BTK-Inhibitor (Abnahme bei 10 μ M: 44,0 \pm 21,3 %) f"uhrte dabei im Vergleich zum Akt-Inhibitor (Abnahme: 22,8 \pm 17,2 %) zu einer st"arckeren Reduktion der CAT-1-Expression. Die Kombination der Inhibitoren f"uhrte jedoch zu keiner st"arckeren Abnahme der CAT-1-Expression (Abnahme bei 10 μ M Akt-Inhibitor + 10 μ M BTK-Inhibitor: 30,3 \pm 22,4 %). Eine suffiziente Inhibition des PI3K/Akt-Signalwegs zeigte sich durch die verminderte Expression von pAkt (Ser473) und pAkt (Thr308) (Abbildung 27B, 27C). Die Inhibition des BZR-Signalwegs wurde durch die verminderte Expression von pPLC γ 2 best"atigt (Abbildung 27D). In der DMSO-Kontrolle zeigte sich jeweils eine verminderte Expression der verschiedenen Proteine im Vergleich zu den unbehandelten Zellen.

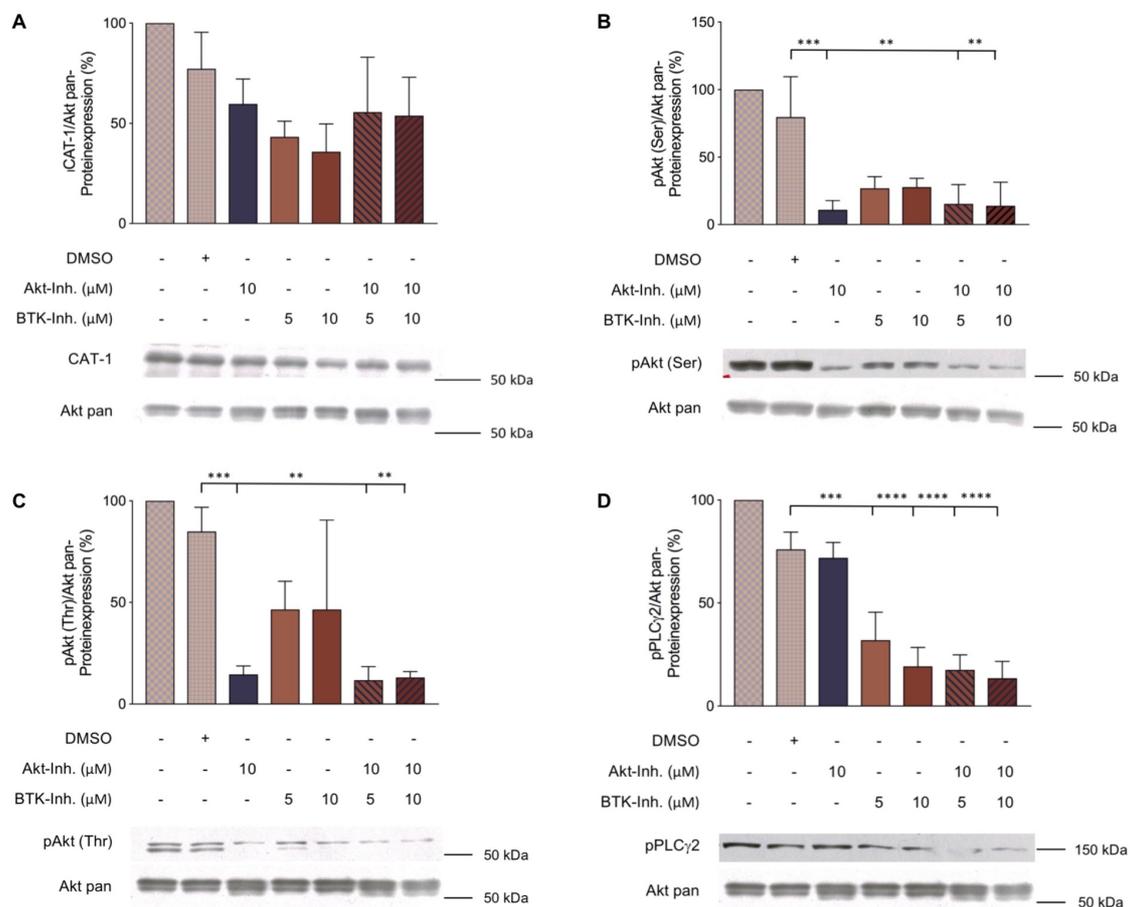


Abbildung 27: Die Kombination des Akt- und BTK-Inhibitors zeigt keinen Einfluss auf die CAT-1-Proteinexpression der CLL-Zelllinie HG3.

HG3-Zellen wurden "uber 48 h in der An- oder Abwesenheit von 10 μ M Akt-Inhibitor, 5 μ M bzw. 10 μ M BTK-Inhibitor oder 0,4 % DMSO als Kontrolle inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Proteinexpression von CAT-1, pAkt (Ser473), pAkt (Thr308) und pPLC γ 2 relativ zur Akt-Expression (als Ladekontrolle) im Western Blot ermittelt. Gezeigt ist die quantitative Messung der A) CAT-1-Expression nach 48 h, B) pAkt (Ser473)-Expression nach 48 h, C) pAkt (Thr308)-Expression nach 48 h und D) pPLC γ 2-Expression nach 48 h (Mittelwerte \pm Standardabweichungen, n = 3 unabh"angige Versuche). Die statistische Auswertung erfolgte mit One-way-Anova und anschlie"endem Tukey-Test. Es wurden jeweils die Zellen, welche in der Gegenwart des Akt- und BTK-Inhibitors inkubiert wurden, mit der DMSO-Kontrolle verglichen. Zum Vergleich der einzelnen Bedingungen wurde dabei jeweils die Kontrollbedingung der unbehandelten Zellen gleich 100 % gesetzt (****: p \leq 0,0001; ***: p \leq 0,001; **: p \leq 0,01). Repr"asentative Western Blot-Analysen f"ur CAT-1 (55 kDa), pAkt (Ser473) (60 kDa), pAkt (Thr308) (60 kDa), pPLC γ 2 (150 kDa) und Akt pan (60 kDa).

Durch die Kombination des Akt- und BTK-Inhibitors konnte keine zusätzliche Reduktion der CAT-1-Proteinexpression erzielt werden. In der DMSO-Kontrolle zeigte sich im Vergleich zur Kontrollbedingung der unbehandelten Zellen jeweils eine verminderte CAT-1-Expression. Eine signifikante Hemmung der CAT-1-Expression bei Inkubation mit dem Akt- und BTK-Inhibitor (Kapitel 5.3.3, 5.4.3) konnte in diesen Versuchen nicht bestätigt werden, was durch die höhere DMSO-Konzentration in der DMSO-Kontrolle begründet werden kann (Diskussion im Kapitel 6.2).

5.6.1.4 Die simultane Inhibition des PI3K/Akt- und BZR-Signalwegs zeigt keinen Einfluss auf die CAT-1-mRNA-Expression der CLL-Zelllinie HG3

Zur Quantifizierung der CAT-1-mRNA-Expression wurde wiederum eine qRT-PCR durchgeführt. Dazu wurden die HG3-Zellen mit dem Akt- und BTK-Inhibitor für 24 Stunden inkubiert.

Nach 24-stündiger Inkubation der HG3-Zellen mit dem Akt- oder BTK-Inhibitor zeigte sich jeweils eine leichte, jedoch nicht signifikante Reduktion der CAT-1-mRNA-Expression (Abbildung 28), die lediglich bei Inkubation mit 5 μM BTK-Inhibitor signifikant ausfiel (Abnahme: $44,5 \pm 8,1$ %). Durch die Kombination der Inhibitoren (10 μM Akt-Inhibitor + 10 μM BTK-Inhibitor) zeigte sich keine weitere Reduktion der CAT-1-mRNA-Expression. In der DMSO-Kontrolle zeigte sich eine leichte Reduktion der CAT-1-Expression im Vergleich zur Kontrollbedingung der unbehandelten Zellen.

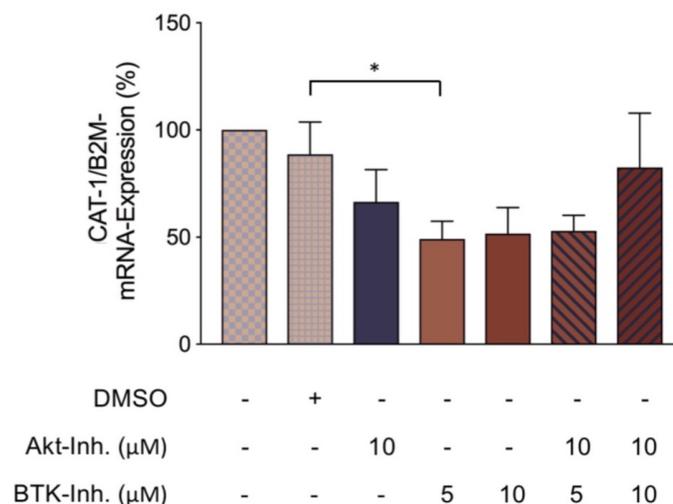


Abbildung 28: Die Kombination des Akt- und BTK-Inhibitors zeigt keinen Einfluss auf die CAT-1-mRNA-Expression der CLL-Zelllinie HG3.

HG3-Zellen wurden über 24 h in der An- oder Abwesenheit von 10 μM Akt-Inhibitor, 5 μM bzw. 10 μM BTK-Inhibitor oder 0,4 % DMSO als Kontrolle inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die mRNA-Expression von CAT-1 relativ zur B2M-Expression (als Ladekontrolle) in der qRT-PCR ermittelt. Gezeigt ist die quantitative Messung der CAT-1-Expression nach 24 h (Mittelwerte \pm Standardabweichungen, $n = 3$ unabhängige Versuche). Die statistische Auswertung erfolgte mit One-way-Anova und anschließendem Tukey-Test. Es wurden jeweils die Zellen, welche in der Gegenwart des Akt- und BTK-Inhibitors inkubiert wurden, mit der DMSO-Kontrolle verglichen. Zum Vergleich der einzelnen Bedingungen wurde dabei jeweils die Kontrollbedingung der unbehandelten Zellen gleich 100 % gesetzt (*: $p \leq 0,05$).

5.6.2 Analyse der CAT-1-Expression der CLL-Zelllinie HG3 bei Kombination des Akt- und NF- κ B-Inhibitors

Im weiteren Verlauf meiner Experimente wurden die HG3-Zellen mit einer Kombination des Akt- und NF- κ B-Inhibitors inkubiert. In den Versuchen mit dem Akt-Inhibitor hatte sich eine signifikante Reduktion der CAT-1-Proteinexpression gezeigt (Kapitel 5.3.3), während diese bei den Versuchen mit dem NF- κ B-Inhibitor nicht zu beobachten war (Kapitel 5.5.3).

5.6.2.1 Die simultane Inhibition des PI3K/Akt- und NF- κ B-Signalwegs reduziert die Viabilität der CLL-Zelllinie HG3

Zur durchflusszytometrischen Messung der Viabilität wurden die HG3-Zellen für 24 und 48 Stunden mit dem Akt- und NF- κ B-Inhibitor in RPMI-Medium inkubiert. Die Inhibitoren wurden in den Dosierungen der Einzelversuche eingesetzt (Kapitel 5.3, Kapitel 5.5). Die DMSO-Kontrolle entsprach der maximal eingesetzten DMSO-Menge (hier 0,95 % DMSO = 9,5 μ l/ml).

Nach 24 Stunden Inkubation der HG3-Zellen mit den Inhibitoren zeigte sich eine Zunahme frühapoptotischer und toter Zellen (Abbildung 29A, 29B). Vor allem bei der Kombination von 10 μ M Akt-Inhibitor und 7,5 μ M NF- κ B-Inhibitor stieg der Anteil frühapoptotischer (Zunahme: 34,2 \pm 8,3 %) und toter Zellen (Zunahme: 32,0 \pm 11,9 %) signifikant an. Eine signifikante Zunahme frühapoptotischer und toter Zellen zeigte sich auch bei 48-stündiger Inkubation der HG3-Zellen bei Kombination des Akt- und NF- κ B-Inhibitors (Abbildung 29C, 29D). Im Vergleich zur Inkubation über 24 Stunden kam es jedoch zu keiner weiteren Zunahme frühapoptotischer und toter Zellen. DMSO zeigte keinen Einfluss auf die Viabilität der HG3-Zellen.

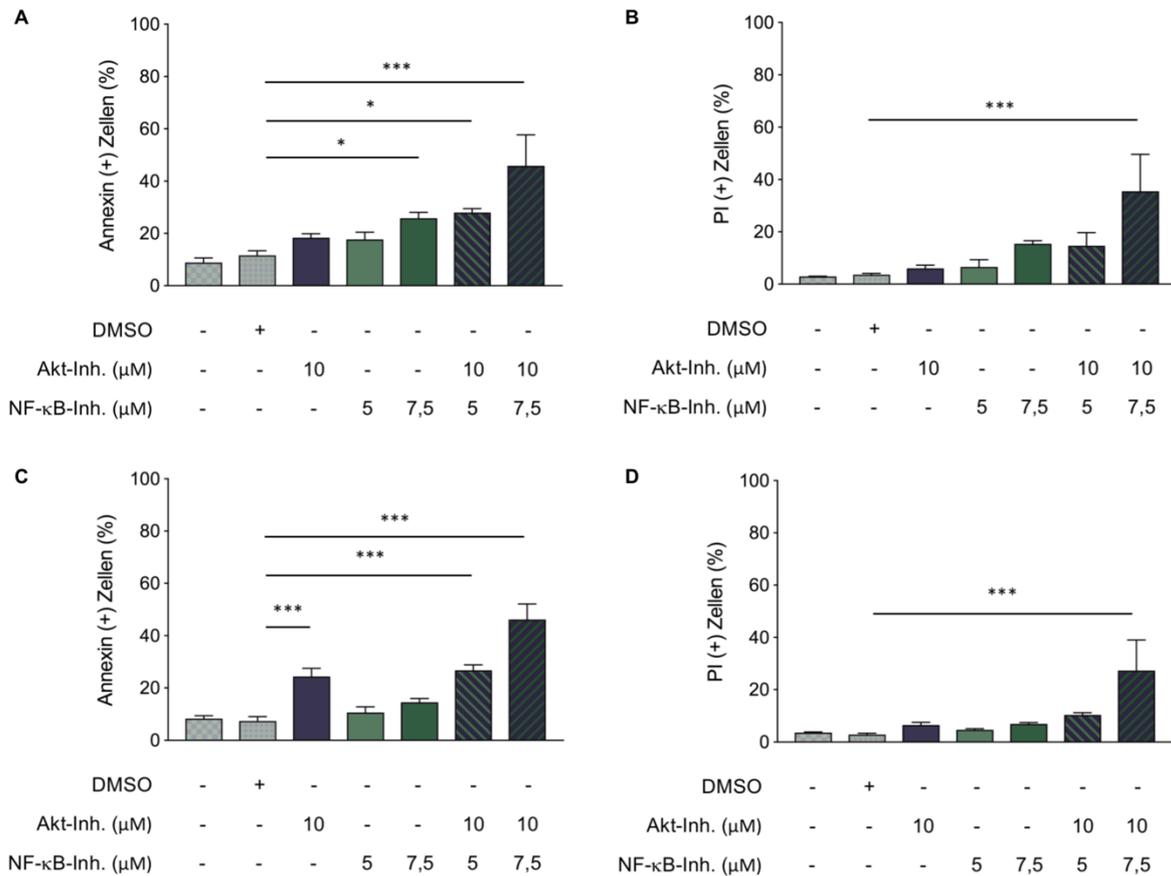


Abbildung 29: Die Viabilität der CLL-Zelllinie HG3 wird durch die Kombination des Akt- und NF-κB-Inhibitors gehemmt. HG3-Zellen wurden über 24 und 48 h in der An- oder Abwesenheit von 10 µM Akt-Inhibitor, 5 µM bzw. 7,5 µM NF-κB-Inhibitor oder 0,95 % DMSO als Kontrolle inkubiert. Anschließend wurde die Viabilität der Zellen nach A,B) 24 und C,D) 48 h durch die durchflusszytometrische Messung von A,C) Annexin-V- und B,D) Propidiumiodid-positiver Zellen festgestellt (Mittelwerte ± Standardabweichungen, n = 3 unabhängige Versuche). Die statistische Auswertung erfolgte mit One-way-Anova und anschließendem Tukey-Test. Es wurden jeweils die Zellen, welche in der Gegenwart des Akt- oder NF-κB-Inhibitors inkubiert wurden, mit der DMSO-Kontrolle verglichen (***: p ≤ 0,001; *: p ≤ 0,05).

Die HG3-Zellen zeigten bei Inkubation mit dem Akt- (10 µM) und NF-κB-Inhibitor (5 µM, 7,5 µM) eine ausreichende Viabilität (mindestens 64,4 ± 11,5 % viable Zellen), weshalb die Zellen zur Proliferationsmessung durch [³H]-Thymidin-Assay und zur Analyse der CAT-1-Expression auf Protein- und mRNA-Ebene isoliert werden konnten.

5.6.2.2 Die simultane Inhibition des PI3K/Akt- und NF-κB-Signalwegs reduziert die Proliferation der CLL-Zelllinie HG3

Die Messung der Proliferation der HG3-Zellen bei Inkubation mit dem Akt- und NF-κB-Inhibitor erfolgte wiederum durch einen [³H]-Thymidin-Assay. Dazu wurden die Zellen für 48 Stunden mit den Inhibitoren inkubiert. Die Kontrollbedingung der unbehandelten Zellen wurde gleich 100 % gesetzt (entspricht 418688 ± 81267 cpm).

Nach 48 Stunden Inkubation der Zellen (Abbildung 30) zeigte sich eine signifikante Abnahme der Proliferation bei Inkubation mit 10 µM Akt-Inhibitor (Abnahme: 94,8 ±

13,9 %) und dem NF- κ B-Inhibitor (Abnahme bei 5 μ M: 93,8 \pm 23,0 %, Abnahme bei 7,5 μ M: 99,9 \pm 13,8 %). Durch die Kombination der Inhibitoren konnte die Proliferation der HG3-Zellen vollständig gehemmt werden. DMSO zeigte keinen Einfluss auf die Proliferation der HG3-Zellen.

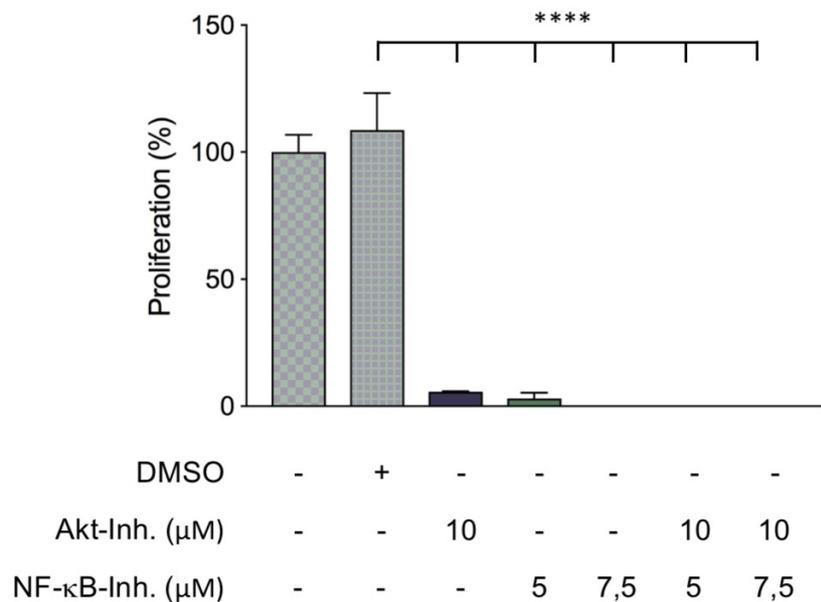


Abbildung 30: Die Proliferation der CLL-Zelllinie HG3 wird durch die Kombination des Akt- und NF- κ B-Inhibitors gehemmt.

HG3-Zellen wurden über 48 h in der An- oder Abwesenheit von 10 μ M Akt-Inhibitor, 5 μ M bzw. 7,5 μ M NF- κ B-Inhibitor oder 0,95 % DMSO als Kontrolle inkubiert. Die Proliferation wurde anschließend durch den Einbau von [3 H]-Thymidin über 16 h ermittelt. Gezeigt ist die quantitative Messung der Proliferation bei Inkubation mit dem Akt- und NF- κ B-Inhibitor nach 48 h (Mittelwerte \pm Standardabweichungen, n = 3 unabhängige Versuche). Die statistische Auswertung erfolgte mit One-way-Anova und anschließendem Tukey-Test. Es wurden jeweils die Zellen, welche in der Gegenwart des Akt- und NF- κ B-Inhibitors inkubiert wurden, mit der DMSO-Kontrolle verglichen. Zum Vergleich der einzelnen Bedingungen wurde dabei jeweils die Kontrollbedingung der unbehandelten Zellen gleich 100 % gesetzt (entspricht 418688 \pm 81267 cpm) (****: p \leq 0,0001).

5.6.2.3 Die simultane Inhibition des PI3K/Akt- und NF- κ B-Signalwegs zeigt keinen Einfluss auf die CAT-1-Proteinexpression der CLL-Zelllinie HG3

Zur Untersuchung der CAT-1-Proteinexpression wurden die HG3-Zellen für 48 Stunden mit dem Akt-Inhibitor (10 μ M) und NF- κ B-Inhibitor (5 μ M, 7,5 μ M) inkubiert. Zur Messung der Proteinexpression wurde dazu wiederum eine SDS-PAGE mit anschließender Western Blot-Analyse durchgeführt. Eine suffiziente Kontrolle des PI3K/Akt-Signalwegs wurde durch die Phosphorylierung von pAkt (Ser473) und pAkt (Thr308) überprüft, während die Inhibition des NF- κ B-Signalwegs durch die starke Proliferationshemmung begründet wurde (Kapitel 5.6.2.2). Die DMSO-Kontrolle entsprach der maximal eingesetzten DMSO-Menge (hier 0,95 % = 9,5 μ l/ml).

Nach 48-stündiger Inkubation der HG3-Zellen mit den Inhibitoren zeigte sich keine signifikante Abnahme der CAT-1-Proteinexpression (Abbildung 31A). Die zur

Überprüfung der Inhibition des PI3K/Akt-Signalwegs gemessene Expression von pAkt (Ser473) und pAkt (Thr308) war tendenziell, jedoch nur im Fall von pAkt (Thr308) signifikant verringert (Abbildung 31B, 31C). In der DMSO-Kontrolle zeigte sich im Vergleich zur Kontrollbedingung der unbehandelten Zellen eine deutliche Reduktion der CAT-1- und pAkt-Proteinexpression.

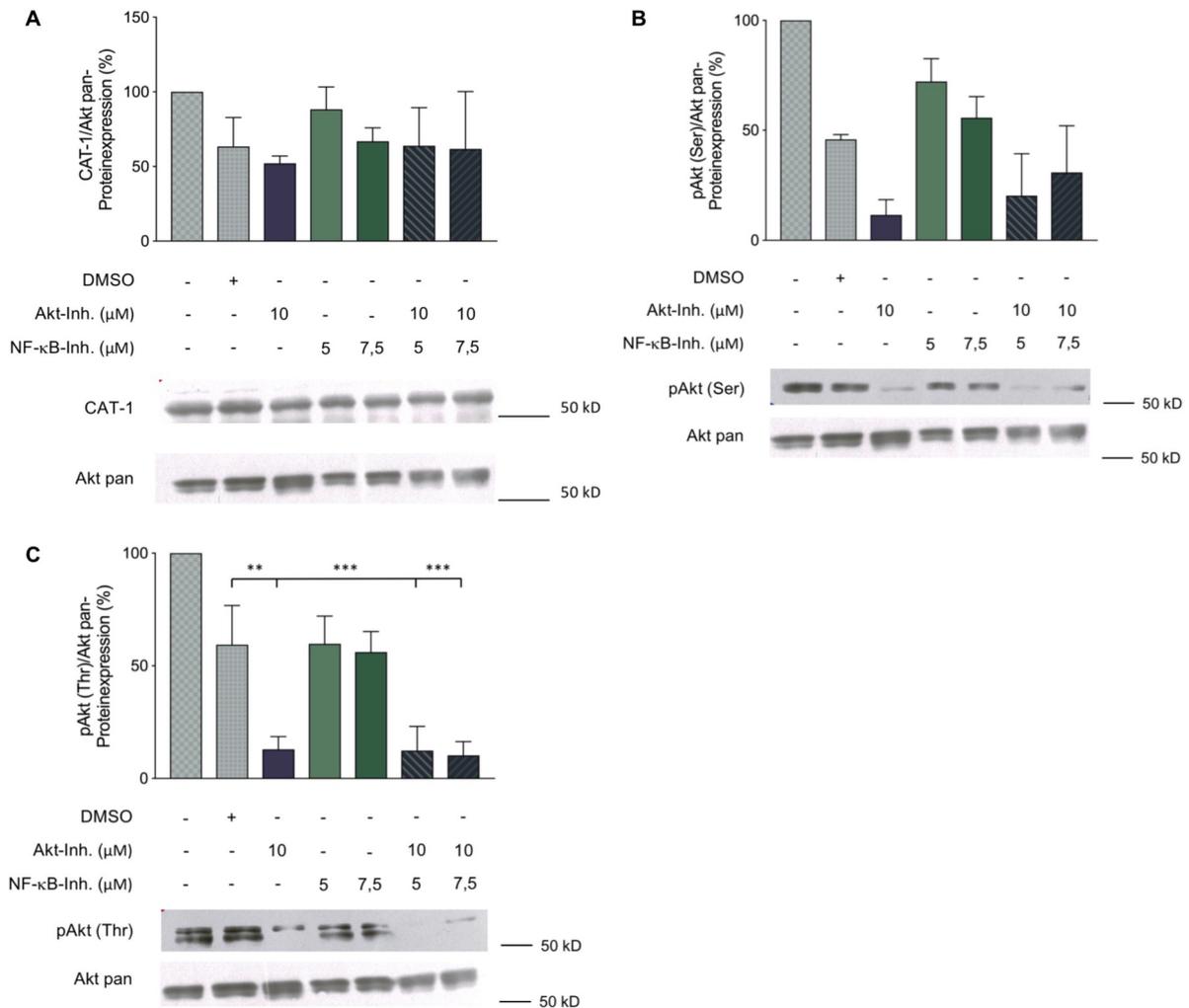


Abbildung 31: Die Kombination des Akt- und NF-κB-Inhibitors zeigt keinen Einfluss auf die CAT-1-Proteinexpression der CLL-Zelllinie HG3.

HG3-Zellen wurden über 48 h in der An- oder Abwesenheit von 10 μM Akt-Inhibitor, 5 μM bzw. 7,5 μM NF-κB-Inhibitor oder 0,95 % DMSO als Kontrolle inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Proteinexpression von CAT-1, pAkt (Ser473) und pAkt (Thr308) relativ zur Akt-Expression (als Ladekontrolle) im Western Blot ermittelt. Gezeigt ist die quantitative Messung der A) CAT-1-Expression nach 48 h, B) pAkt (Ser473)-Expression nach 48 h, C) pAkt (Thr308)-Expression nach 48 h (Mittelwerte ± Standardabweichungen, n = 3 unabhängige Versuche). Die statistische Auswertung erfolgte mit One-way-Anova und anschließendem Tukey-Test. Es wurden jeweils die Zellen, welche in der Gegenwart des Akt- und NF-κB-Inhibitors inkubiert wurden, mit der DMSO-Kontrolle verglichen. Zum Vergleich der einzelnen Bedingungen wurde dabei jeweils die Kontrollbedingung der unbehandelten Zellen gleich 100 % gesetzt (***: p ≤ 0,001; **: p ≤ 0,01). Repräsentative Western Blot-Analysen für CAT-1 (55 kDa), pAkt (Ser473) (60 kDa), pAkt (Thr308) (60 kDa) und Akt pan (60 kDa).

Durch die Kombination des Akt- und NF-κB-Inhibitors konnte keine zusätzliche Reduktion der CAT-1-Proteinexpression erzielt werden. In der DMSO-Kontrolle zeigte sich im Vergleich zur Kontrollbedingung der unbehandelten Zellen eine deutliche Reduktion der CAT-1-Expression.

5.6.2.4 Die simultane Inhibition des PI3K/Akt- und NF- κ B-Signalwegs zeigt keinen Einfluss auf die CAT-1-mRNA-Expression der CLL-Zelllinie HG3

Zur Quantifizierung der CAT-1-mRNA-Expression wurde wiederum eine qRT-PCR durchgeführt. Dazu wurden die HG3-Zellen mit dem Akt- und NF- κ B-Inhibitor für 24 Stunden inkubiert.

Nach 24 Stunden Inkubation der HG3-Zellen mit dem Akt- und NF- κ B-Inhibitor zeigte sich keine Reduktion der CAT-1-mRNA-Expression (Abbildung 32). Auch durch die Kombination der Inhibitoren konnte keine Reduktion der CAT-1-Expression erzielt werden. In der DMSO-Kontrolle zeigte sich eine deutliche Reduktion der CAT-1-Expression im Vergleich zur Kontrollbedingung der unbehandelten Zellen.

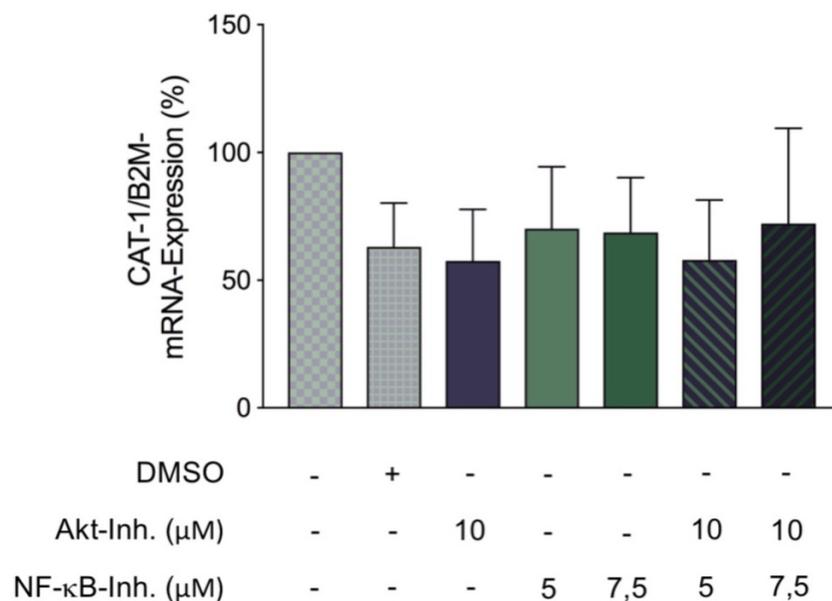


Abbildung 32: Die Kombination des Akt- und NF- κ B-Inhibitors zeigt keinen Einfluss auf die CAT-1-mRNA-Expression der CLL-Zelllinie HG3.

HG3-Zellen wurden über 24 h in der An- oder Abwesenheit von 10 μ M Akt-Inhibitor, 5 μ M bzw. 7,5 μ M NF- κ B-Inhibitor oder 0,95 % DMSO als Kontrolle inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die mRNA-Expression von CAT-1 relativ zur B2M-Expression (als Ladekontrolle) in der qRT-PCR ermittelt. Gezeigt ist die quantitative Messung der CAT-1-Expression nach 24 h (Mittelwerte \pm Standardabweichungen, $n = 3$ unabhängige Versuche). Die statistische Auswertung erfolgte mit One-way-Anova und anschließendem Tukey-Test. Es wurden jeweils die Zellen, welche in der Gegenwart des Akt- und NF- κ B-Inhibitors inkubiert wurden, mit der DMSO-Kontrolle verglichen. Zum Vergleich der einzelnen Bedingungen wurde dabei jeweils die Kontrollbedingung der unbehandelten Zellen gleich 100 % gesetzt.

5.6.3 Analyse der CAT-1-Expression der CLL-Zelllinie HG3 bei Kombination des BTK- und NF- κ B-Inhibitors

Zuletzt wurden die HG3-Zellen mit einer Kombination des BTK- und NF- κ B-Inhibitors inkubiert. Die Versuche mit dem BTK-Inhibitor hatten eine signifikante Reduktion der CAT-1-Proteinexpression gezeigt (Kapitel 5.4.3).

5.6.3.1 Die simultane Inhibition des BTK- und NF- κ B-Signalwegs reduziert die Viabilität der CLL-Zelllinie HG3

Zur durchflusszytometrischen Messung der Viabilität wurden die HG3-Zellen für 24 und 48 Stunden mit dem BTK- und NF- κ B-Inhibitor in RPMI-Medium inkubiert. Die Inhibitoren wurden in den Dosierungen der Einzelversuche eingesetzt (Kapitel 5.4, Kapitel 5.5). Die DMSO-Kontrolle entsprach der maximal eingesetzten DMSO-Menge (hier 0,95 % DMSO = 0,95 μ l/ml).

Nach 24-stündiger Inkubation der HG3-Zellen mit den Inhibitoren zeigte sich bei Kombination der Inhibitoren ein signifikanter Anstieg frühapoptotischer (Zunahme bei 10 μ M BTK-Inhibitor + 7,5 μ M NF- κ B-Inhibitor: 22,7 \pm 5,2 %) und toter Zellen (Zunahme bei 10 μ M BTK-Inhibitor + 7,5 μ M NF- κ B-Inhibitor: 23,4 \pm 3,2 %) (Abbildung 33A, 33B). Bei Inkubation der Zellen mit einem der Inhibitoren kam es zu einer nicht signifikanten Zunahme frühapoptotischer und toter Zellen. Die Zunahme frühapoptotischer und toter Zellen bei Kombination der Inhibitoren ist ebenfalls nach 48 Stunden Inkubation nachweisbar (Abbildung 33C, 33D). Im Vergleich zur Inkubation über 24 Stunden kam es zu einem weiteren Anstieg der frühapoptotischen (Zunahme bei 10 μ M BTK-Inhibitor + 7,5 μ M NF- κ B-Inhibitor: 44,8 \pm 11,7 %) und toten Zellen (Zunahme bei 10 μ M BTK-Inhibitor + 7,5 μ M NF- κ B-Inhibitor: 29,4 \pm 14,1 %). DMSO zeigte keinen Einfluss auf die Viabilität der HG3-Zellen.

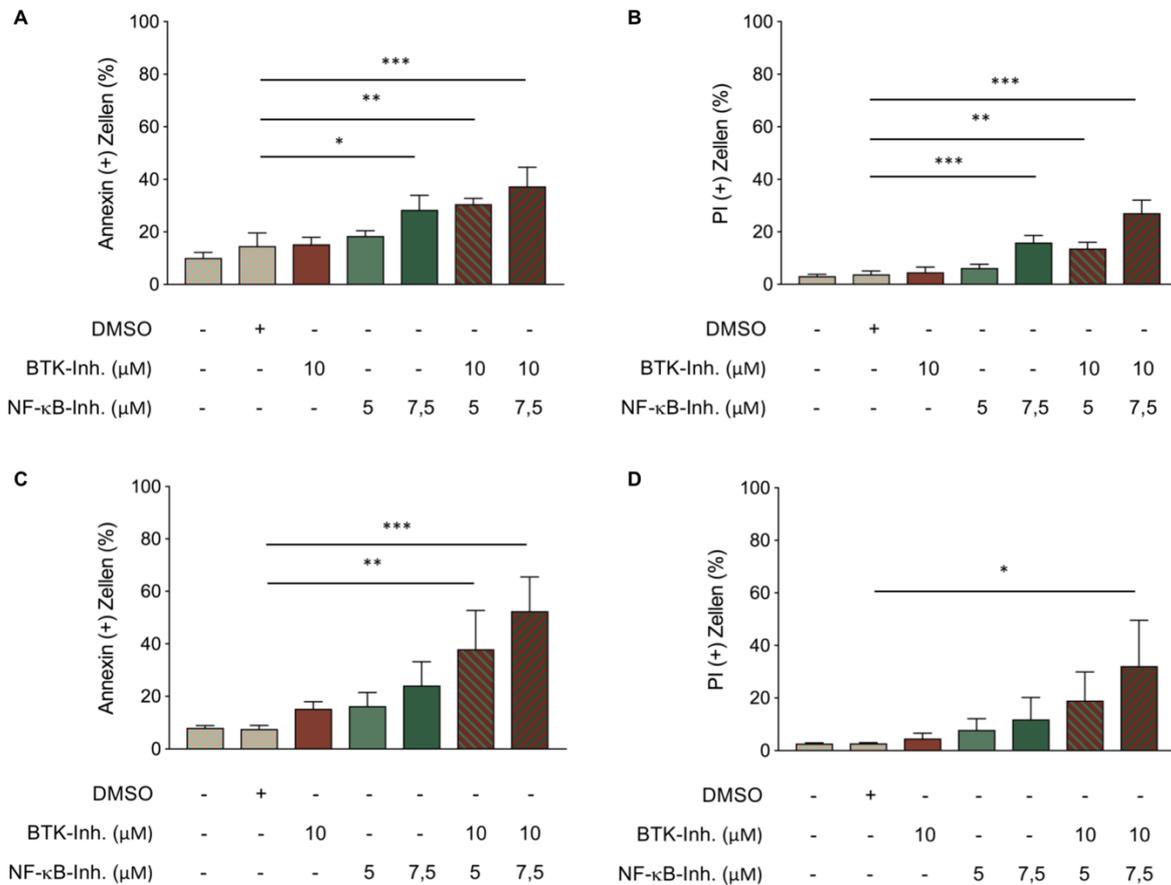


Abbildung 33: Die Viabilität der CLL-Zelllinie HG3 wird durch die Kombination des BTK- und NF-κB-Inhibitors gehemmt. HG3-Zellen wurden über 24 und 48 h in der An- oder Abwesenheit von 10 μM BTK-Inhibitor, 5 μM bzw. 7,5 μM NF-κB-Inhibitor oder 0,95 % DMSO als Kontrolle inkubiert. Anschließend wurde die Viabilität der Zellen nach A,B) 24 und C,D) 48 h durch die durchflusszytometrische Messung von A,C) Annexin-V- und B,D) Propidiumiodid-positiver Zellen festgestellt (Mittelwerte ± Standardabweichungen, n = 3 unabhängige Versuche). Die statistische Auswertung erfolgte mit One-way-Anova und anschließendem Tukey-Test. Es wurden jeweils die Zellen, welche in der Gegenwart des BTK- oder NF-κB-Inhibitors inkubiert wurden, mit der DMSO-Kontrolle verglichen (***: p ≤ 0,001; **: p ≤ 0,01; *: p ≤ 0,05).

Die HG3-Zellen zeigten bei Inkubation mit dem BTK- (10 μM) und NF-κB-Inhibitor (5 μM, 7,5 μM) eine ausreichende Viabilität (mindestens 67,8 ± 14,2 % viable Zellen), weshalb die Zellen zur Proliferationsmessung durch [³H]-Thymidin-Assay und zur Analyse der CAT-1-Expression auf Protein- und mRNA-Ebene isoliert werden konnten.

5.6.3.2 Die simultane Inhibition des BZR- und NF-κB-Signalwegs reduziert die Proliferation der CLL-Zelllinie HG3

Die Messung der Proliferation der HG3-Zellen bei Inkubation mit dem BTK- und NF-κB-Inhibitor erfolgte wiederum durch einen [³H]-Thymidin-Assay. Dazu wurden die Zellen für 48 Stunden mit den Inhibitoren inkubiert. Die Kontrollbedingung der unbehandelten Zellen wurde gleich 100 % gesetzt (entspricht 368120 ± 75259 cpm).

Nach 48 Stunden Inkubation der Zellen (Abbildung 34) zeigte sich eine signifikante Abnahme der Proliferation bei Inkubation mit dem BTK-Inhibitor (Abnahme bei 10 μ M BTK-Inhibitor: 77,7 \pm 23,4 %). Bei Inkubation mit dem NF- κ B-Inhibitor zeigte sich eine nahezu vollständige Hemmung der Proliferation (Abnahme bei 7,5 μ M NF- κ B-Inhibitor: 99,6 \pm 23,7 %). Durch die Kombination der Inhibitoren konnte die Proliferation vollständig aufgehoben werden (Abnahme bei 10 μ M BTK-Inhibitor + 7,5 μ M NF- κ B-Inhibitor: 99,9 \pm 22,9 %). DMSO zeigte keinen Einfluss auf die Proliferation der HG3-Zellen.

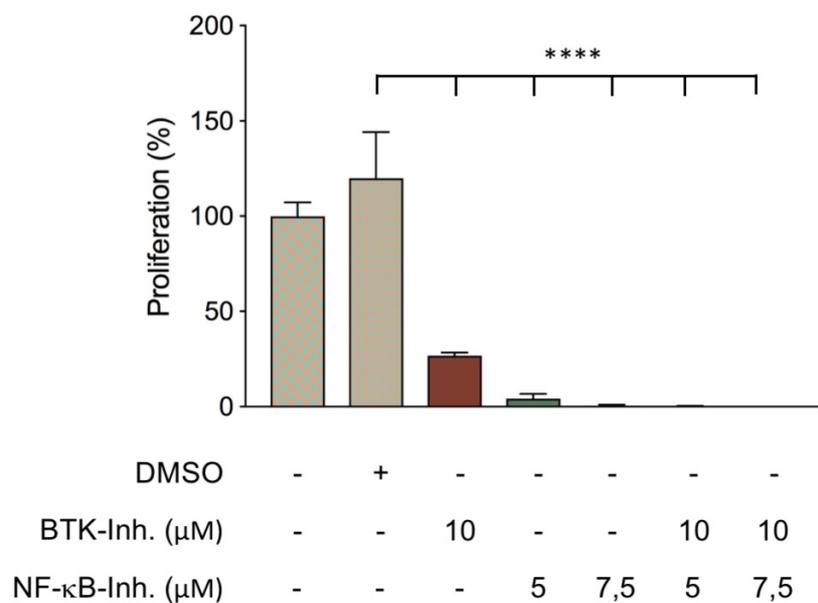


Abbildung 34: Die Proliferation der CLL-Zelllinie HG3 wird durch die Kombination des BTK- und NF- κ B-Inhibitors gehemmt.

HG3-Zellen wurden über 48 h in der An- oder Abwesenheit von 10 μ M BTK-Inhibitor, 5 μ M bzw. 7,5 μ M NF- κ B-Inhibitor oder 0,95 % DMSO als Kontrolle inkubiert. Die Proliferation wurde anschließend durch den Einbau von [3 H]-Thymidin über 16 h ermittelt. Gezeigt ist die quantitative Messung der Proliferation bei Inkubation mit dem BTK- und NF- κ B-Inhibitor nach 48 h (Mittelwerte \pm Standardabweichungen, n = 3 unabhängige Versuche). Die statistische Auswertung erfolgte mit One-way-Anova und anschließendem Tukey-Test. Es wurden jeweils die Zellen, welche in der Gegenwart des BTK- und NF- κ B-Inhibitors inkubiert wurden, mit der DMSO-Kontrolle verglichen. Zum Vergleich der einzelnen Bedingungen wurde dabei jeweils die Kontrollbedingung der unbehandelten Zellen gleich 100 % gesetzt (entspricht 368120 \pm 75259 cpm) verglichen (****: p \leq 0,0001).

5.6.3.3 Die simultane Inhibition des BZR- und NF- κ B-Signalwegs zeigt keinen Einfluss auf die CAT-1-Proteinexpression der CLL-Zelllinie HG3

Zur Untersuchung der CAT-1-Proteinexpression wurden die HG3-Zellen für 48 Stunden mit dem BTK- (10 μ M) und NF- κ B-Inhibitor (5 μ M, 7,5 μ M) inkubiert. Zur Messung der Proteinexpression wurde wiederum eine SDS-PAGE mit anschließender Western Blot-Analyse durchgeführt. Eine suffiziente Kontrolle des BZR-Signalwegs wurde im Western Blot durch die Phosphorylierung von pPLC γ 2 überprüft. Die Inhibition des NF κ B-Signalwegs wurde durch die starke Proliferationshemmung

begründet (Kapitel 5.6.3.2). Die DMSO-Kontrolle entsprach der maximal eingesetzten DMSO-Menge (hier 0,95 % = 9,5 μ l/ml).

Nach 48-stündiger Inkubation der HG3-Zellen mit dem BTK- und NF- κ B-Inhibitor zeigte sich eine nicht signifikante Abnahme der CAT-1-Proteinexpression (Abbildung 35A). Diese konnte am stärksten bei der Kombination von 10 μ M BTK-Inhibitor und 5 μ M NF- κ B-Inhibitor beobachtet werden (Abnahme: 58,0 \pm 7,7 %). Einzig bei der Kombination von 10 μ M BTK-Inhibitor und 7,5 μ M NF- κ B-Inhibitor zeigte sich kein Effekt auf die CAT-1-Expression (hier jedoch große Streuung der Ergebnisse, SD = 75,4 %). Eine suffiziente Inhibition des BZR-Signalwegs konnte durch die verminderte Expression von pPLC γ 2 bestätigt werden (Abbildung 35B).

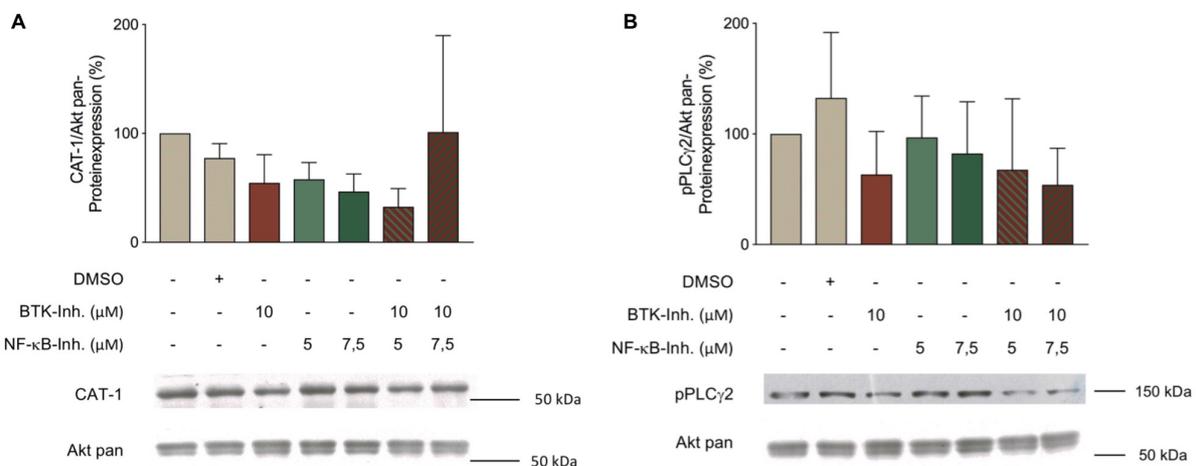


Abbildung 35: Die Kombination des BTK- und NF- κ B-Inhibitors zeigt keinen Einfluss auf die CAT-1-Proteinexpression der CLL-Zelllinie HG3.

HG3-Zellen wurden über 48 h in der An- oder Abwesenheit von 10 μ M BTK-Inhibitor, 5 μ M bzw. 7,5 μ M NF- κ B-Inhibitor oder 0,95 % DMSO als Kontrolle inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Proteinexpression von CAT-1, pPLC γ 2 relativ zur Akt-Expression (als Ladekontrolle) im Western Blot ermittelt. Gezeigt ist die quantitative Messung der A) CAT-1-Expression nach 48 h und B) pPLC γ 2-Expression nach 48 h (Mittelwerte \pm Standardabweichungen, n = 3 unabhängige Versuche). Die statistische Auswertung erfolgte mit One-way-Anova und anschließendem Tukey-Test. Es wurden jeweils die Zellen, welche in der Gegenwart des BTK- und NF- κ B-Inhibitors inkubiert wurden, mit der DMSO-Kontrolle verglichen. Zum Vergleich der einzelnen Bedingungen wurde dabei jeweils die Kontrollbedingung der unbehandelten Zellen gleich 100 % gesetzt. Repräsentative Western Blot-Analysen für CAT-1 (55 kDa), pPLC γ 2 (150 kDa) und Akt pan (60 kDa).

Durch die Kombination von 10 μ M BTK-Inhibitor und 5 μ M NF- κ B-Inhibitor konnte eine leichte, jedoch nicht signifikante Reduktion der CAT-1-Proteinexpression erzielt werden, während die Kombination von 10 μ M BTK-Inhibitor und 7,5 μ M NF- κ B-Inhibitor keinen Effekt auf die CAT-1-Expression zeigte. In der DMSO-Kontrolle zeigte sich im Vergleich zur Kontrollbedingung der unbehandelten Zellen eine nicht signifikant verminderte CAT-1-Expression.

5.6.3.4 Die simultane Inhibition des BZR- und NF- κ B-Signalwegs zeigt keinen Einfluss auf die CAT-1-mRNA-Expression der CLL-Zelllinie HG3

Zur Quantifizierung der CAT-1-mRNA-Expression wurde wiederum eine qRT-PCR durchgeführt. Dazu wurden die HG3-Zellen mit dem BTK- und NF- κ B-Inhibitor für 24 Stunden inkubiert.

Nach 24-stündiger Inkubation der HG3-Zellen mit 10 μ M BTK-Inhibitor zeigte sich eine nicht signifikante Reduktion der CAT-1-mRNA-Expression (Abnahme: $26,4 \pm 9,1$ %) (Abbildung 36). Bei der Inkubation mit dem NF- κ B-Inhibitor wiederum war kein Einfluss auf die Expression der CAT-1-mRNA zu beobachten. Durch die Kombination von 10 μ M BTK-Inhibitor + 7,5 μ M NF- κ B-Inhibitor kam es im Vergleich zur alleinigen Inkubation mit 10 μ M BTK-Inhibitor tendenziell zu einer Zunahme der CAT-1-Expression. In der DMSO-Kontrolle zeigte sich eine deutliche Reduktion der CAT-1-mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrollbedingung der unbehandelten Zellen.

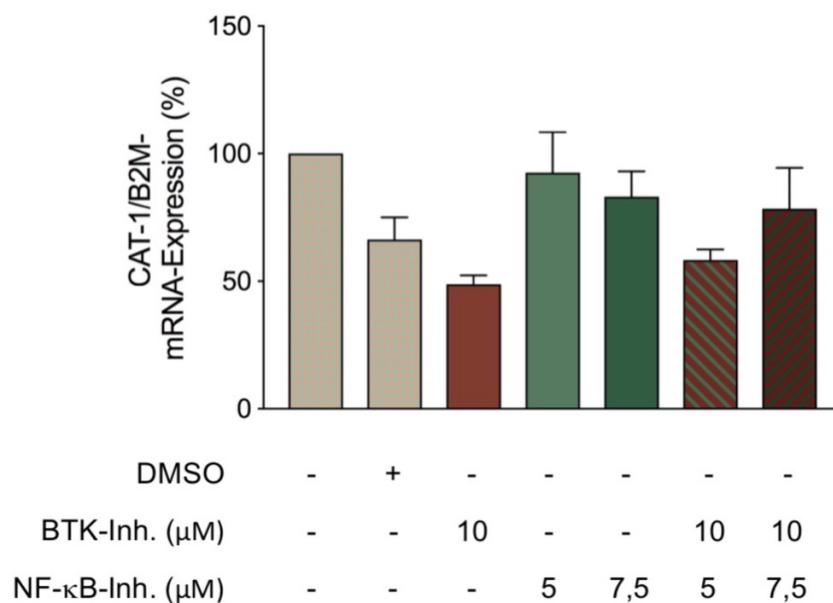


Abbildung 36: Die Kombination des BTK- und NF- κ B-Inhibitors zeigt keinen Einfluss auf die CAT-1-mRNA-Expression der CLL-Zelllinie HG3.

HG3-Zellen wurden über 24 h in der An- oder Abwesenheit von 10 μ M BTK-Inhibitor, 5 μ M bzw. 7,5 μ M NF- κ B-Inhibitor oder 0,95 % DMSO als Kontrolle inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die mRNA-Expression von CAT-1 relativ zur B2M-Expression (als Ladekontrolle) in der qRT-PCR ermittelt. Gezeigt ist die quantitative Messung der CAT-1-Expression nach 24 h (Mittelwerte \pm Standardabweichungen, $n = 3$ unabhängige Versuche). Die statistische Auswertung erfolgte mit One-way-Anova und anschließendem Tukey-Test. Es wurden jeweils die Zellen, welche in der Gegenwart des BTK- und NF- κ B-Inhibitors inkubiert wurden, mit der DMSO-Kontrolle verglichen. Zum Vergleich der einzelnen Bedingungen wurde dabei jeweils die Kontrollbedingung der unbehandelten Zellen gleich 100 % gesetzt.

5.7 Analyse der CAT-1-Expression primärer CLL-Zellen bei Inkubation mit dem Akt-, BTK- und NF- κ B-Inhibitor

Nach Abschluss der Experimente mit der CLL-Zelllinie HG3 wurden die Effekte der Signalweginhibition auf die CAT-1-Expression in primären CLL-Zellen untersucht. Dafür wurden Blutproben von CLL-Patienten (Einverständnis gemäß der Deklaration von Helsinki) verwendet, welche die folgenden Voraussetzungen erfüllten:

- Unbehandelte CLL-Patienten
- > 100 Leukozyten/nl
- > 80 % Lymphozyten (der Leukozyten)

Humane primäre CLL-Zellen wurden über Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation aus peripherem Vollblut von CLL-Patienten isoliert. Aus dem Blut isolierte Lymphozyten befinden sich bei der CLL in der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus und proliferieren daher nicht. Aus diesem Grund wurden die aus dem Blut isolierten, in der G₀/G₁-Phase befindlichen, primären CLL-Zellen über den TLR9 mit ODN-2006 (7,5 μ g/ml) stimuliert, wodurch die Proliferation angeregt wird [173]. Durch die Stimulation der primären CLL-Zellen über den TLR9 kommt es neben einer verstärkten Proliferation auch zu einer Hochregulation der CAT-1-Expression, wie bereits in vorherigen Experimenten gezeigt werden konnte [10].

Zur Untersuchung der Effekte der Signalweginhibition auf die CAT-1-Expression in primären CLL-Zellen wurden die gleichen Experimente wie bei den Versuchen mit der CLL-Zelllinie HG3 durchgeführt. Zunächst erfolgte jedoch eine Reinheitskontrolle mit Hilfe der Durchflusszytometrie, wobei verschiedene B-Zell-/CLL-Zell-spezifische (CD5, CD19) und T-Zell-spezifische (CD3) Oberflächenmarker überprüft wurden. Nach durchflusszytometrischer Messung der Viabilität erfolgte die Proliferationsmessung durch [³H]-Thymidin-Assay und zuletzt die Messung der CAT-1-Proteinexpression durch SDS-PAGE und anschließende Western Blot-Analyse.

In Vorversuchen zeigten die primären CLL-Zellen eine deutliche Reduktion der Viabilität (mehr als 80 % tote Zellen) bei Verwendung der Inhibitor-Konzentrationen und Inkubationszeiten aus den Versuchen mit der CLL-Zelllinie HG3. Nach Durchführung von Dosisfindungsversuchen wurden die einzelnen Inhibitoren daher in der Dosierung 5 μ M für eine Dauer von 24 Stunden mit den primären CLL-Zellen inkubiert. Aufgrund einer in den Kombinationsversuchen gemessenen DMSO-abhängigen CAT-1-Expression wurden dem Versuchsansatz mehrere DMSO-Kontrollen hinzugefügt. Diese entsprachen den unterschiedlichen DMSO-Mengen, die

bei den einzelnen Inhibitoren oder bei Kombination der Inhibitoren verwendet wurden (hier 0,2 %, 0,5 % und 0,6 % DMSO). Die 0,2 % DMSO-Kontrolle (2 μ l/ml) entsprach der eingesetzten DMSO-Menge bei Inkubation der CLL-Zellen mit dem Akt-Inhibitor, dem BTK-Inhibitor oder dem Akt- + BTK-Inhibitor. Die 0,5 % DMSO-Kontrolle (5 μ l/ml) entsprach der eingesetzten DMSO-Menge bei Inkubation der CLL-Zellen mit dem NF- κ B-Inhibitor. Die 0,6 % DMSO-Kontrolle (6 μ l/ml) entsprach der eingesetzten DMSO-Menge bei Inkubation der CLL-Zellen mit dem Akt- + NF- κ B-Inhibitor oder dem BTK- + NF- κ B-Inhibitor (Tabelle 20).

Tabelle 20: Übersicht über die verwendeten DMSO-Kontrollen

	Dazugehörige DMSO-Kontrolle
Akt-Inhibitor	0,2 % DMSO (2 μ l/ml)
BTK-Inhibitor	0,2 % DMSO (2 μ l/ml)
Akt- + BTK-Inhibitor	0,2 % DMSO (2 μ l/ml)
NF-κB-Inhibitor	0,5 % DMSO (5 μ l/ml)
Akt- + NF-κB-Inhibitor	0,6 % DMSO (6 μ l/ml)
BTK- + NF-κB-Inhibitor	0,6 % DMSO (6 μ l/ml)

Eine Kontrolle der Signalweginhibition konnte bei den Versuchen mit den primären CLL-Zellen nicht nach SDS-PAGE im Western Blot überprüft werden, da die zuvor verwendeten Primärantikörper keine zuverlässigen und reproduzierbaren Ergebnisse lieferten. Daher konnte auf die Wirksamkeit der Inhibitoren lediglich über die Hemmung der Proliferation zurückgeschlossen werden.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Versuche mit den primären CLL-Zellen zusammengefasst dargestellt. Einzig die Immunphänotypisierung der isolierten Lymphozyten wird jeweils einzeln betrachtet.

5.7.1 Die Immunphänotypisierung der einzelnen Patientenproben zeigt jeweils eine überwiegend CD5⁺-B-Zellpopulation der durch Ficoll-Gradientenzentrifugation isolierten, primären CLL-Zellen

Nach Isolation der primären CLL-Zellen durch Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation erfolgte eine durchflusszytometrische Reinheitskontrolle mit Antikörpern gegen CD3, CD5 und CD19. Charakteristisch für CLL-Zellen ist die Koexpression der Differenzierungsantigene CD5 und CD19, während CD3 auf der Oberfläche von CLL-Zellen nicht exprimiert wird [168]. Im Folgenden werden die drei Patienten-Blutproben nacheinander betrachtet.

Zunächst wurden jeweils die isolierten Lymphozyten nach Größe (FSC-Kanal) und Granularität (SSC-Kanal) ausgewählt bzw. eingegrenzt (Abbildung 37A). Mit Hilfe der IgG1 κ -Isotypkontrolle (Abbildung 37B) wurde durchflusszytometrisch der Anteil CD3⁺-, CD5⁺- und CD19⁺-Zellen quantitativ bestimmt. Dabei befanden sich in den durch Ficoll-Gradientenzentrifugation isolierten Zellen der ersten Patientenprobe 7,3 % CD3⁺-Zellen (Abbildung 37C), 99,3 % CD5⁺-Zellen (Abbildung 37D) und 64,1 % CD19⁺-Zellen (Abbildung 37E).

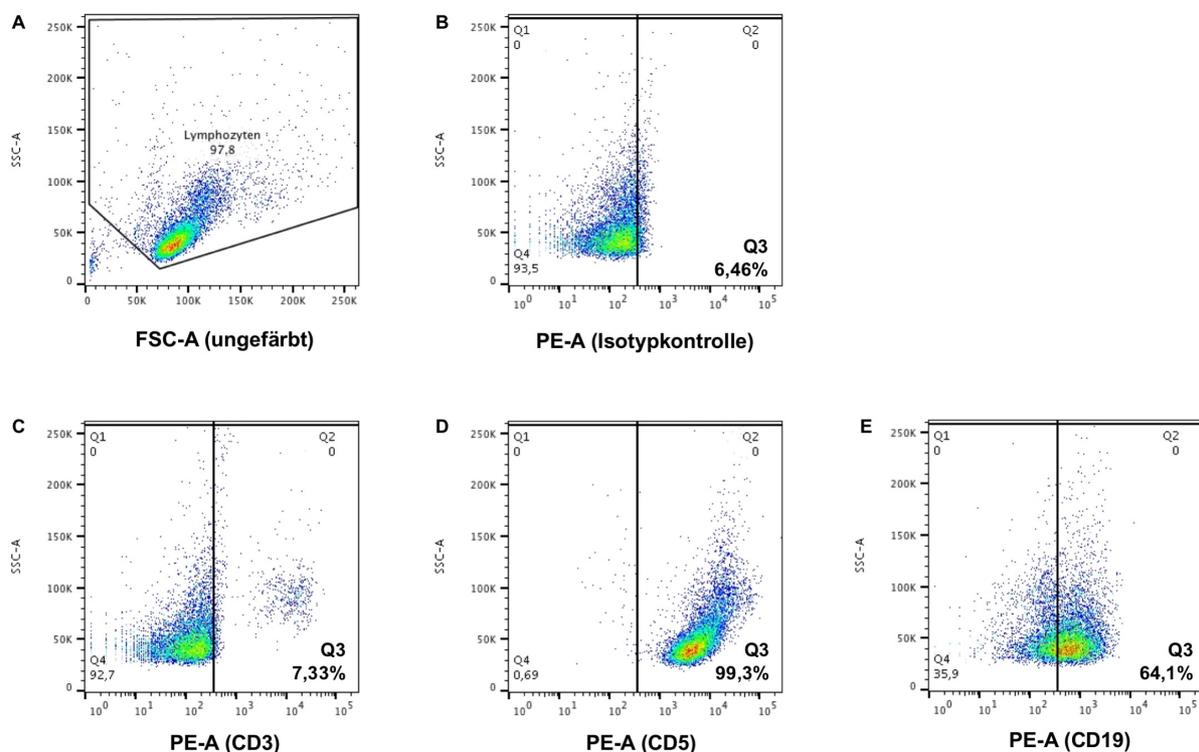


Abbildung 37: Die Immunphänotypisierung der primären CLL-Zellen zeigt eine CD5⁺-B-Zell-Population.

CLL-Zellen wurden durch Ficoll-Gradientenzentrifugation und Entnahme der Interphase aus dem Blut von CLL-Patienten isoliert. Anschließend wurden die Zellen mit fluoreszenzmarkierten anti-CD3-, anti-CD5- und anti-CD19-Antikörpern für 15 min inkubiert und der Anteil CD3⁺-, CD5⁺- und CD19⁺-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Gezeigt ist die quantitative Messung der CD3⁺- (C), CD5⁺- (D) und CD19⁺-Zellen (E) im Vergleich zur IgG κ 1-Isotypkontrolle (B).

Nach Isolation der primären CLL-Zellen aus der ersten Patientenprobe zeigte sich eine homogene CD5⁺- und CD3⁻- Zellpopulation, die zudem überwiegend CD19⁺ ist. Der geringere Anteil CD19⁺-Zellen konnte bei einer homogenen Zellpopulation durch die schwächere CD19-Expression einzelner CLL-Zellen begründet werden.

Die Reinheitskontrolle der beiden verbliebenen CLL-Patientenblutproben erfolgte ebenfalls durchflusszytometrisch mit Antikörpern gegen CD3, CD5 und CD19.

Dabei wurden wiederum die isolierten Lymphozyten zunächst nach Größe (FSC-Kanal) und Granularität (SSC-Kanal) ausgewählt bzw. eingegrenzt (Abbildung 39A) und im Anschluss wurde mit Hilfe der IgG1 κ -Isotypkontrolle (Abbildung 39B) der Anteil CD3⁺-, CD5⁺- und CD19⁺-Zellen quantitativ bestimmt. Dabei befanden sich in den durch Ficoll-Gradientenzentrifugation isolierten Zellen der zweiten Patientenprobe 51,1 % CD3⁺-Zellen (Abbildung 38C), 93,2 % CD5⁺-Zellen (Abbildung 38D) und 52,7 % CD19⁺-Zellen (Abbildung 38E).

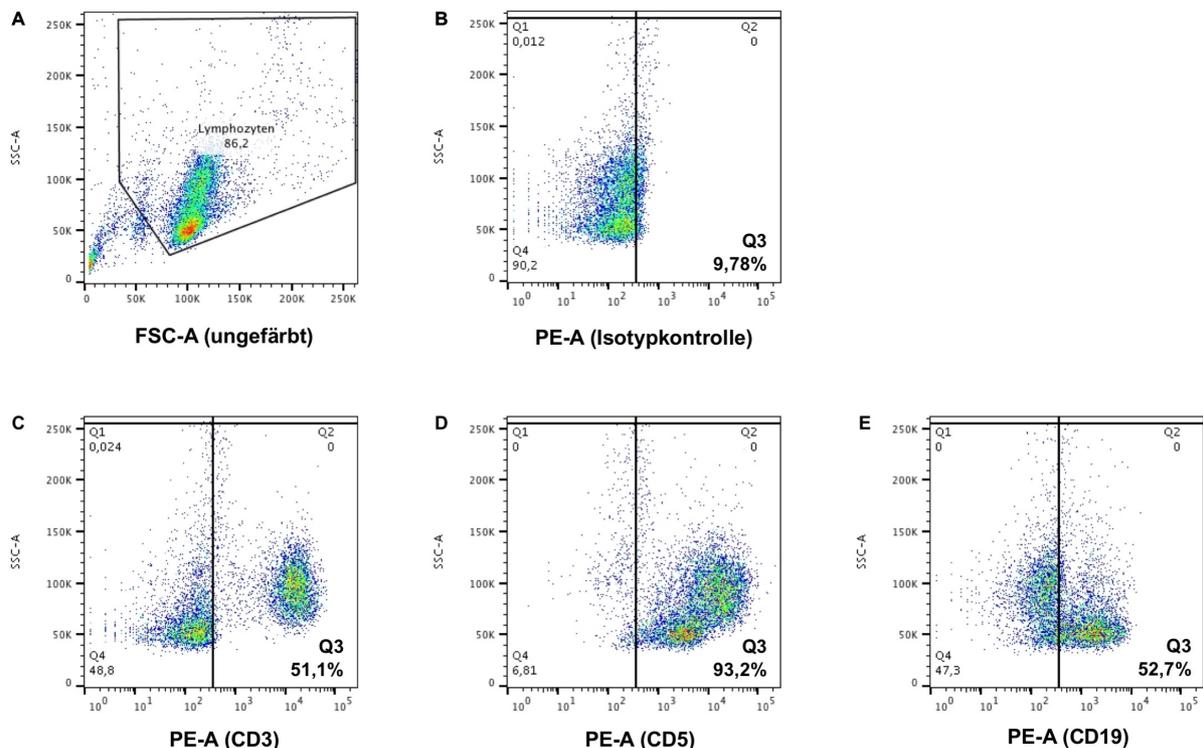


Abbildung 38: Die Immunphänotypisierung der primären CLL-Zellen zeigt eine überwiegend CD5⁺-B-Zell-Population. CLL-Zellen wurden durch Ficoll-Gradientenzentrifugation und Entnahme der Interphase aus dem Blut von CLL-Patienten isoliert. Anschließend wurden die Zellen mit fluoreszenzmarkierten anti-CD3-, anti-CD5- und anti-CD19-Antikörpern für 15 min inkubiert und der Anteil CD3⁺-, CD5⁺- und CD19⁺-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Gezeigt ist die quantitative Messung der CD3⁺- (C), CD5⁺- (D) und CD19⁺-Zellen (E) im Vergleich zur IgG κ 1-Isotypkontrolle (B).

Nach Isolation der primären CLL-Zellen zeigte sich neben einer homogenen CD5⁺-Zellpopulation, die zudem überwiegend CD19⁺ war, eine weitere CD3⁺-Zellpopulation. Der geringere Anteil CD19⁺-Zellen konnte durch den großen Anteil CD3⁺-T-Zellen und bei einer homogenen Zellpopulation durch eine schwächere CD19-Expression einzelner CLL-Zellen begründet werden.

Die Reinheitskontrolle der dritten Patientenprobe erfolgte ebenfalls durch die durchflusszytometrische Messung CD3-, CD5- und CD19-positiver Zellen. Dabei befanden sich in den isolierten Zellen 21,1 % CD3⁺-Zellen (Abbildung 41C), 97,6 % CD5⁺-Zellen (Abbildung 41D) und 53,2 % CD19⁺-Zellen (Abbildung 41E).

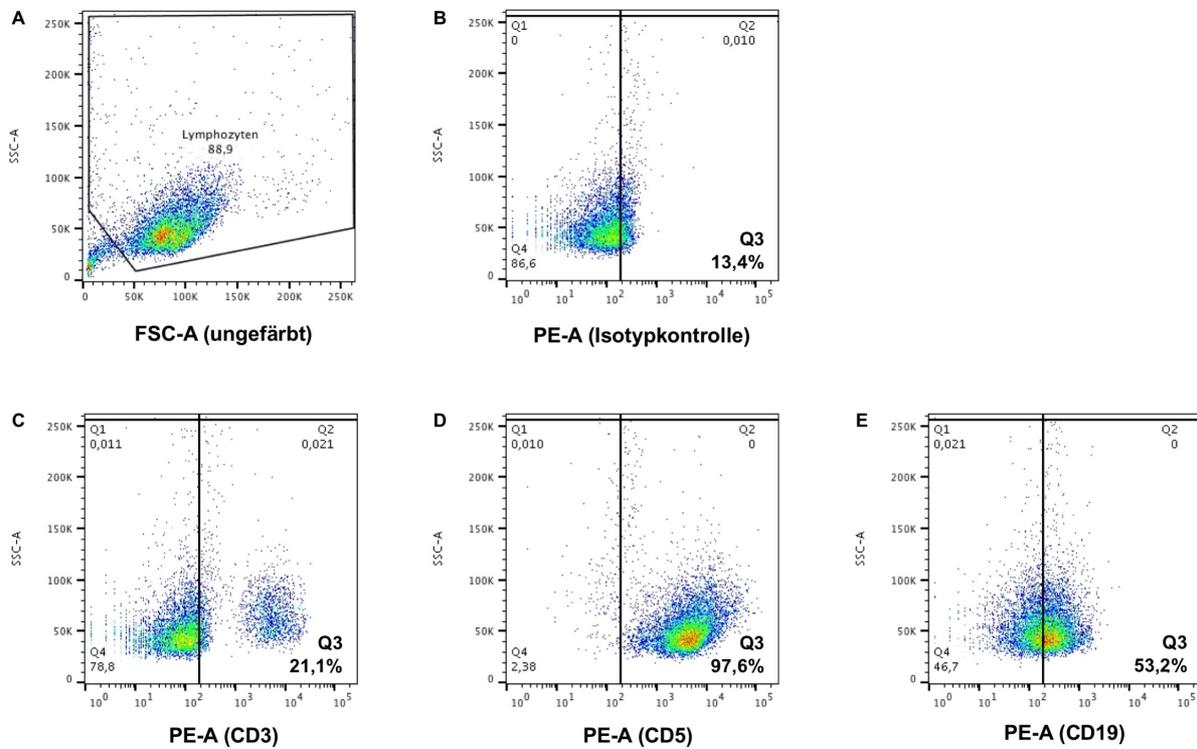


Abbildung 39: Die Immunphänotypisierung der primären CLL-Zellen zeigt eine überwiegend CD5⁺-B-Zell-Population. CLL-Zellen wurden durch Ficoll-Gradientenzentrifugation und Entnahme der Interphase aus dem Blut von CLL-Patienten isoliert. Anschließend wurden die Zellen mit fluoreszenzmarkierten anti-CD3-, anti-CD5- und anti-CD19-Antikörpern für 15 min inkubiert und der Anteil CD3⁺-, CD5⁺- und CD19⁺-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Gezeigt ist die quantitative Messung der CD3⁺- (C), CD5⁺- (D) und CD19⁺-Zellen (E) im Vergleich zur IgGκ1-Isotypkontrolle (B).

In der dritten Patientenprobe zeigte sich nach Isolation der Zellen eine homogene CD5⁺- und überwiegend CD3⁻-Zellpopulation, die zudem zu einem großen Teil CD19⁺ war. Der geringere Anteil CD19⁺-Zellen konnte wiederum bei einer homogenen Zellpopulation durch eine schwächere CD19-Expression einzelner CLL-Zellen begründet werden.

Eine genaue Übersicht der CD3⁺-, CD5⁺- und CD19⁺-Expression der primären CLL-Zellen der Patientenproben ist Tabelle 20 zu entnehmen.

Tabelle 21: Anteil CD3⁺-, CD5⁺- und CD19⁺-Zellen in den Patientenproben

	CD3 ⁺ -Zellen	CD5 ⁺ -Zellen	CD19 ⁺ -Zellen
Patientenprobe 1	7,3 %	99,3 %	64,1 %
Patientenprobe 2	51,1 %	93,2 %	52,7 %
Patientenprobe 3	21,1 %	97,6 %	53,2 %

5.7.2 Die Inhibition des PI3K/Akt-, BZR- und NF- κ B-Signalwegs reduziert die Viabilität, Proliferation und CAT-1-Proteinexpression der primären CLL-Zellen

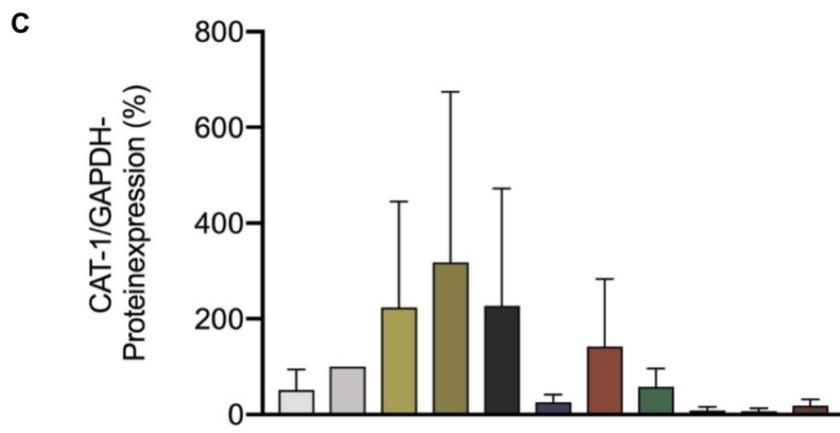
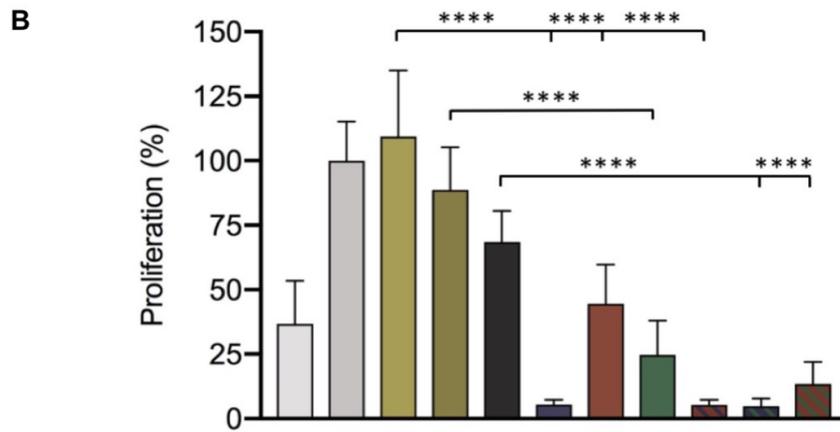
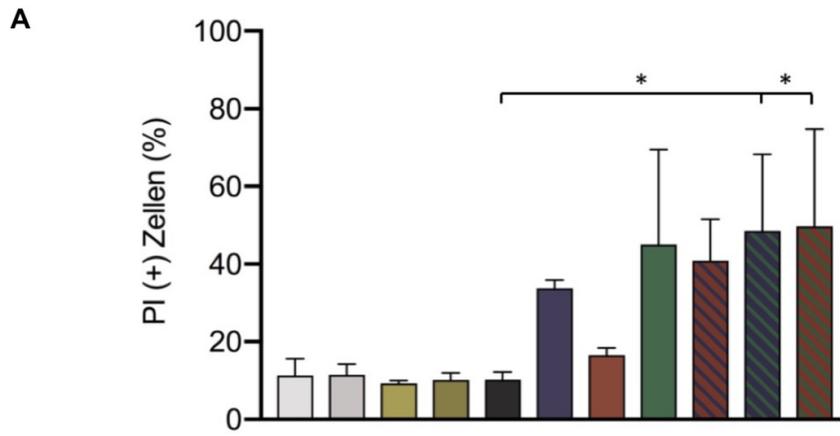
Zur durchflusszytometrischen Messung der Viabilität der primären CLL-Zellen wurden die Zellen für 24 Stunden mit den Inhibitoren (jeweils 5 μ M) in RPMI-Medium inkubiert. Es wurden dem Versuchsansatz mehrere DMSO-Kontrollen (0,2 %, 0,5 %, 0,6 %) hinzugefügt. Die verschiedenen Effekte der Inhibitoren wurden dabei auf die jeweils zugehörige DMSO-Kontrolle bezogen (Tabelle 20).

Nach 24 Stunden Inkubation zeigte sich keine Zunahme toter Zellen bei Stimulation der primären CLL-Zellen über TLR9 mit ODN-2006 (7,5 μ g/ml) (Abbildung 38A). Bei Inkubation der primären CLL-Zellen mit DMSO kam es ebenfalls nicht zu einem Anstieg toter Zellen (Abbildung 38A). Die Inkubation mit Akt- oder NF- κ B-Inhibitor führte zu einer deutlichen Zunahme toter Zellen (Zunahme bei 5 μ M Akt-Inhibitor: 24,4 \pm 2,0 %, Zunahme bei 5 μ M NF- κ B-Inhibitor: 35,0 \pm 18,4 %), wohingegen sich im Vergleich bei Inkubation mit dem BTK-Inhibitor nur ein leichter Anstieg toter Zellen beobachten ließ (Zunahme: 7,2 \pm 1,9 %) (Abbildung 38A). Vor allem bei der Inkubation mit dem NF- κ B-Inhibitor zeigten sich zwischen den drei Patientenproben deutlich unterschiedliche Auswirkungen auf die Viabilität, wie die große Standardabweichung der Messwerte bei Inkubation mit dem NF- κ B-Inhibitor zeigt (SD = 19,9 %). Durch die Kombination der einzelnen Inhibitoren kam es zu einer weiteren Zunahme toter Zellen (Zunahme bei 5 μ M Akt- + 5 μ M BTK-Inhibitor: 31,5 \pm 9,1 %, Zunahme bei 5 μ M Akt- + 5 μ M NF- κ B-Inhibitor: 38,3 \pm 15,2 %, Zunahme bei 5 μ M BTK- + 5 μ M NF- κ B-Inhibitor: 39,5 \pm 18,8 %) (Abbildung 38A).

Trotz der deutlichen Inhibition der Viabilität bei Kombination der Inhibitoren entschieden wir uns zur Verwendung der primären CLL-Zellen zur Proliferationsmessung durch einen [3 H]-Thymidin-Assay. Die zum Teil starke Inhibition der Viabilität wurde bei der Beurteilung der folgenden Ergebnisse berücksichtigt. Die Kontrollbedingung der unbehandelten Zellen wurde gleich 100 % gesetzt (entspricht 2802 \pm 401 cpm). Durch die Stimulation der primären CLL-Zellen über TLR9 mit ODN-2006 (7,5 μ g/ml) kam es zu einem Anstieg der Proliferation (Abbildung 38B). Durch eine steigende DMSO-Konzentration kam es zu einer zunehmenden Hemmung der Proliferation (Abbildung 38B). Bei Inkubation mit 5 μ M Akt-Inhibitor konnte die Proliferation der primären CLL-Zellen fast vollständig gehemmt werden (Abnahme: 95,0 \pm 23,2 %) (Abbildung 38B). Die Inkubation mit dem BTK- und NF- κ B-Inhibitor

fürhte ebenfalls zu einer signifikanten Hemmung der Proliferation (Abnahme bei 5 μ M BTK-Inhibitor: $59,3 \pm 17,1$ %, Abnahme bei 5 μ M NF- κ B-Inhibitor: $72,1 \pm 28,5$ %) (Abbildung 38B). Die Proliferationshemmung des BTK- und NF- κ B-Inhibitors konnte durch die Kombination der Inhibitoren nochmals verstärkt werden (Abnahme: $80,5 \pm 23,2$ %) (Abbildung 38B). Die Inkubation mit dem NF- κ B-Inhibitor zeigte wiederum deutlich unterschiedliche Auswirkungen auf die Proliferation der primären CLL-Zellen. Während die Proliferation in der Patientenprobe 3 um mehr als 90 % reduziert werden konnte, führte die Inkubation mit dem NF- κ B-Inhibitor in den Patientenproben 1 und 2 lediglich zu einer 60%igen Proliferationshemmung (SD = 11,7 %). Bei Kombination des Akt- und BTK-Inhibitors sowie Akt- und NF- κ B-Inhibitors zeigte sich ebenfalls eine starke Reduktion der Proliferation (Abnahme bei 5 μ M Akt- + 5 μ M BTK-Inhibitor: $95,1 \pm 23,0$ %, Abnahme bei 5 μ M Akt- + 5 μ M NF- κ B-Inhibitor: $92,9 \pm 18,3$ %) (Abbildung 38B).

Zuletzt wurde zur Messung der CAT-1-Proteinexpression eine SDS-PAGE mit anschließender Western Blot-Analyse durchgeführt. Eine wirksame Inhibition der Signalwege wurde durch die starke Hemmung der Proliferation begründet. Durch die Stimulation der primären CLL-Zellen über TLR-9 kam es zu einer leichten Induktion der CAT-1-Proteinexpression (Abbildung 38C). Diese war jedoch lediglich in einer Patientenprobe signifikant, während in den anderen Proben keine Induktion der CAT-1-Expression nach Stimulation über TLR-9 registriert werden konnte. Eine Inkubation der primären CLL-Zellen mit DMSO (hier 0,1 %, 0,2 % und 0,6 % DMSO) zeigte keinen Einfluss auf die CAT-1-Proteinexpression (Abbildung 38C). 5 μ M Akt-Inhibitor führte zu einer deutlichen Reduktion der CAT-1-Proteinexpression (Abnahme: $88,5 \pm 18,0$ %) (Abbildung 38C). Diese war bei Inkubation mit dem BTK- und NF- κ B-Inhibitor weniger stark ausgeprägt (Abnahme bei BTK-Inhibitor: $36,3 \pm 0,3$ %, Abnahme bei NF- κ B-Inhibitor: $81,8 \pm 32,1$ %) (Abbildung 38C). Vor allem bei der Inkubation mit dem NF- κ B-Inhibitor zeigte sich wiederum eine deutliche Varianz in der Reduktion der CAT-1-Expression, wie auch die große Standardabweichung zeigt (SD = 34,3 %). Durch die Kombination der Inhibitoren konnte die CAT-1-Proteinexpression noch stärker gehemmt werden (Abnahme bei 5 μ M Akt- + 5 μ M BTK-Inhibitor: $96,2 \pm 7,3$ %, Abnahme bei 5 μ M Akt- + 5 μ M NF- κ B-Inhibitor: $96,9 \pm 6,0$ %, Abnahme bei 5 μ M BTK- + 5 μ M NF- κ B-Inhibitor: $91,9 \pm 15,4$ %) (Abbildung 38C).



TLR9	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DMSO (%)	-	-	0,2	0,5	0,6	-	-	-	-	-
Akt-Inh. (μM)	-	-	-	-	-	5	-	-	5	5
BTK-Inh. (μM)	-	-	-	-	-	-	5	-	5	5
NF-κB-Inh. (μM)	-	-	-	-	-	-	-	5	-	5



Abbildung 40: Die Viabilität, Proliferation und CAT-1-Proteinexpression der primären CLL-Zellen werden durch den Akt-, BTK- und NF- κ B-Inhibitor gehemmt.

A) B-Zellen wurden durch Ficoll-Gradientenzentrifugation und Entnahme der Interphase aus dem Blut von CLL-Patienten isoliert und über 24 h in der An- oder Abwesenheit von 5 μ M Akt-Inhibitor, 5 μ M BTK-Inhibitor, 5 μ M NF- κ B-Inhibitor oder DMSO (0,2 %, 0,5 % und 0,6 %) als Kontrolle inkubiert. Anschließend wurde die Viabilität der Zellen nach 24 h durch die durchflusszytometrische Messung Propidiumiodid-positiver Zellen festgestellt (Mittelwerte \pm Standardabweichungen, n = 3 unabhängige Versuche). Die statistische Auswertung erfolgte mit One-way-Anova und anschließendem Tukey-Test. Es wurden die Zellen bei Kultivierung mit dem Akt-, BTK- und NF- κ B-Inhibitor mit den Zellen bei Kultivierung mit den DMSO-Kontrollen verglichen (*: p \leq 0,05).

B) B-Zellen wurden nach Stimulation über TLR9 (ODN-2006: 7,5 μ g/ml) über 24 h in der An- oder Abwesenheit von 5 μ M Akt-Inhibitor, 5 μ M BTK-Inhibitor, 5 μ M NF- κ B-Inhibitor oder DMSO (0,2 %, 0,5 % und 0,6 %) als Kontrolle inkubiert. Die Proliferation wurde anschließend durch den Einbau von [3 H]-Thymidin über 16 h ermittelt. Gezeigt ist die quantitative Messung der Proliferation bei Inkubation mit dem Akt-, BTK- und NF- κ B-Inhibitor nach 24 h (Mittelwerte \pm Standardabweichungen, n = 3 unabhängige Versuche). Die statistische Auswertung erfolgte mit One-way-Anova und anschließendem Tukey-Test. Es wurden die Zellen bei Kultivierung mit dem Akt-, BTK- und NF- κ B-Inhibitor mit den Zellen bei Kultivierung mit den DMSO-Kontrollen verglichen. Zum Vergleich der einzelnen Bedingungen wurde dabei jeweils die Kontrollbedingung der unbehandelten, stimulierten Zellen gleich 100 % gesetzt (entspricht 2802 \pm 401 cpm) (****: p \leq 0,0001).

C) B-Zellen wurden nach Stimulation über TLR9 (ODN-2006: 7,5 μ g/ml) über 24 h in der Anwesenheit von 5 μ M Akt-Inhibitor, 5 μ M BTK-Inhibitor, 5 μ M NF- κ B-Inhibitor oder DMSO (0,2 %, 0,5 % und 0,6 %) als Kontrolle inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Proteinexpression von CAT-1 relativ zur GAPDH-Expression (als Ladekontrolle) im Western Blot ermittelt. Gezeigt ist die quantitative Messung der CAT-1-Expression nach 24 h (Mittelwerte \pm Standardabweichungen, n = 3 unabhängige Versuche). Die statistische Auswertung erfolgte mit One-way-Anova und anschließendem Tukey-Test. Es wurden jeweils die Zellen, welche in der Gegenwart des Akt-, BTK- und NF- κ B-Inhibitors inkubiert wurden, mit den DMSO-Kontrollen verglichen. Zum Vergleich der einzelnen Bedingungen wurde dabei die Kontrollbedingung der unbehandelten, stimulierten Zellen gleich 100 % gesetzt.

D) Repräsentative Western Blot-Analysen für CAT-1 (55 kDa) und GAPDH (37 kDa).

Sowohl die Inkubation mit dem Akt-Inhibitor als auch die mit dem BTK- und NF- κ B-Inhibitor führten zu einer signifikant reduzierten Proliferation der primären CLL-Zellen. Diese war bei Inkubation mit dem Akt-Inhibitor am stärksten und konnte durch die Kombination der Inhibitoren nochmals verstärkt werden. Zudem zeigte sich auch eine Reduktion der CAT-1-Proteinexpression primärer CLL-Zellen bei Inkubation mit den Inhibitoren. Wiederum wurde die CAT-1-Proteinexpression bei Inkubation mit dem Akt-Inhibitor am stärksten gehemmt und konnte durch die Kombination der Inhibitoren fast vollständig aufgehoben werden. Diese Effekte auf die Proliferation und CAT-1-Expression sind jedoch unter Berücksichtigung der teils stark reduzierten Viabilität zu betrachten, wobei es vor allem bei der Inkubation mit dem NF- κ B-Inhibitor und bei Kombination der Inhibitoren zu einer starken Reduktion viabler Zellen kam.

5.8 Vereinfachte Darstellung der Effekte der Inhibitoren

Tabelle 22: Vereinfachte Darstellung der Effekte der Inhibitoren

(↓ = Reduktion > 25 %, ↓↓ = Reduktion > 50 %, ↓↓↓ = Reduktion > 75 %, ↔ = keine signifikante Reduktion)

		CLL-Zelllinie HG3	Primäre CLL-Zellen
Akt-Inhibitor	Proliferation	↓↓↓	↓↓↓
	CAT-1-Proteinexpression	↓	↓↓↓*
	CAT-1-mRNA-Expression	↔	
BTK-Inhibitor	Proliferation	↓↓	↓↓
	CAT-1-Proteinexpression	↓	↓*
	CAT-1-mRNA-Expression	↔	
NF-κB-Inhibitor	Proliferation	↓↓↓	↓↓
	CAT-1-Proteinexpression	↔	↓↓*
	CAT-1-mRNA-Expression	↔	
Akt- + BTK- Inhibitor	Proliferation	↓↓↓	↓↓↓
	CAT-1-Proteinexpression	↔	↓↓↓*
	CAT-1-mRNA-Expression	↔	
Akt- + NF-κB- Inhibitor	Proliferation	↓↓↓	↓↓↓
	CAT-1-Proteinexpression	↔	↓↓↓*
	CAT-1-mRNA-Expression	↔	
BTK- + NF-κB- Inhibitor	Proliferation	↓↓↓	↓↓↓
	CAT-1-Proteinexpression	↔	↓↓↓*
	CAT-1-mRNA-Expression	↔	

* = fehlende Signifikanz der Ergebnisse

6 Diskussion

6.1 Aktueller Stand in der Therapie der CLL

Die Chronische Lymphatische Leukämie (CLL) ist die häufigste Leukämie-Erkrankung in den westlichen Ländern. Charakteristisch kommt es zur Anreicherung von reifen, CD5⁺/CD23⁺ neoplastischen B-Lymphozyten im Blut, den Lymphknoten, dem Knochenmark und anderen lymphatischen Organen [23]. Der Häufigkeitsgipfel liegt dabei zwischen dem 70. und 75. Lebensjahr und zeigt eine weite Altersspannbreite [14]. Aufgrund des Anstiegs der Inzidenz mit zunehmendem Lebensalter ist mit einem Anstieg der CLL-Prävalenz in den nächsten Jahrzehnten durch den demographischen Wandel zu rechnen.

In den letzten Jahren kam es zur Etablierung neuer zielgerichteter Medikamente in der Erst- und Zweitlinientherapie der CLL. Dabei handelt es sich um Inhibitoren der B-Zell-Rezeptor-Signaltransduktion (Ibrutinib, Acalabrutinib, Idelalisib) sowie um den Bcl-2-Inhibitor Venetoclax. Diese führen über eine Hemmung der B-Zell-Rezeptor-Signaltransduktion oder über eine Enthemmung der Apoptose von B-Lymphozyten zu einem verlängerten Gesamtüberleben von CLL-Patienten [174] [175]. Nichtsdestotrotz bleibt die CLL weiterhin eine medikamentös nicht heilbare Erkrankung. Daher bedarf es der Entwicklung weiterer innovativer Therapie-Ansätze. Ein in den letzten Jahren stärker verfolgter Ansatz stellt dabei der Eingriff in den Metabolismus von Tumorzellen dar [1] [2]. Dabei sind Tumorzellen in ihrem Wachstum und ihrer Viabilität in erheblichem Maße von Aminosäuren abhängig [5] [6]. Die Aminosäure Arginin stellt dabei neben ihrer Funktion als Proteinbaustein einen wichtigen Metaboliten dar, da sie den für den Tumor wichtigen Stickstoff liefert und in die Synthese weiterer wichtiger Stoffwechselprodukte mündet [176].

Im Gegensatz zu physiologischen Zellen können einige Tumorentitäten die Aminosäure Arginin nicht aus Citrullin synthetisieren, da sie das Enzym Argininosuccinat-Synthetase (ASS) intrazellulär nicht exprimieren (Arginin-Auxotrophie) [7] [8] [9]. Dazu zählen neben weiteren Leukämie-Formen und soliden Tumoren unter anderem auch CLL-Zellen [10]. Eine Depletion von extrazellulärem Arginin führt dabei zu einer fast vollständigen Hemmung der Proliferation und Viabilität der CLL-Zellen. Aus diesem Grund sind CLL-Zellen abhängig von der Aufnahme von Arginin über Aminosäure-Transporter. Den einzigen, unter physiologischen Bedingungen in CLL-Zellen exprimierten Arginin-Importer stellt dabei der humane kationische Aminosäure-Transporter CAT-1 dar [10]. Ein CAT-1-knockout führt zu einer starken Hemmung der Proliferation und Viabilität in der CLL-Zelllinie HG3 sowie

zu einer Hemmung des CLL-Wachstums und einem längeren Überleben im murinen Tumor-Modell [10].

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung von Signalwegen in humanen CLL-Zellen, die für die Expression des CAT-1 in die Zellmembran verantwortlich sind. Es sollte analysiert werden, ob durch eine Inhibition der Signalwege eine Hemmung der CAT-1-Expression erzielt werden kann, wodurch wiederum die Proliferation der CLL-Zellen gehemmt und die Apoptose der Zellen induziert werden sollte. Die Rolle der verschiedenen Signalwege in CLL-Zellen hinsichtlich der Expression von Aminosäuretransportern war dabei im Wesentlichen noch unklar. Die Ergebnisse dieser Arbeit ergänzen bisherige Erkenntnisse zu wichtigen Signalwegen in CLL-Zellen.

6.2 Einordnung in die Literaturdiskussion

Tumorzellen zeichnen sich durch einen hohen Bedarf an Nährstoffen wie Aminosäuren und Glukose aus, da sie diese für ihr Wachstum und ihre Viabilität benötigen [1]. Dazu werden in Tumorzellen unterschiedliche Signalwege hochreguliert, um die Nährstoffe vermehrt aufnehmen und in der Folge weiter verstoffwechseln zu können. Der Metabolismus von Tumorzellen unterscheidet sich dabei häufig deutlich von dem physiologischer Zellen (als Beispiel sei der sogenannte „Warburg-Effekt“ genannt, der die bevorzugte Energiegewinnung durch aerobe Glykolyse statt durch oxidative Phosphorylierung beschreibt [177]). Dieser tumorspezifische Metabolismus stellt einen Ansatz für die Entwicklung neuer Therapieansätze in der Tumorthapie dar.

Das Tumorwachstum ist dabei im Wesentlichen auch von der Zufuhr exogener Aminosäuren abhängig, die für die Synthese von Proteinen, Nukleinsäuren, Lipiden und ATP benötigt werden [178]. Aus diesem Grund zeigt sich bei vielen Tumorentitäten eine erhöhte Expression von Aminosäure-Transportern, welche die für den Tumor essentiellen Aminosäuren importieren [178] [179] [44] [37]. Dafür häufig hochregulierte Transporter sind die System L-Transporter: LAT1 (SCL7A5), LAT2 (SLC7A8), LAT3 (SLC43A1) und LAT4 (SLC43A2). Die LAT-Transporter vermitteln die natriumunabhängige Aufnahme verzweigtkettiger und aromatischer Aminosäuren wie Leucin, Isoleucin, Phenylalanin, Valin, Methionin, Tyrosin, Histidin und Tryptophan (Kapitel 2.3). Vor allem der LAT1-Expression kommt in Tumorzellen dabei eine entscheidende Rolle zu. Nach Daten der GENT-Datenbank [180] ist der LAT1 in einem Großteil aller Tumorentitäten exprimiert. Eine Überexpression ist dabei häufig mit einer verstärkten Metastasierung assoziiert [181]. Durch den Transport verzweigtkettiger

und aromatischer Aminosäuren führt der LAT1 unter anderem über die Aufnahme von Leucin zur Translokation des mTORC1-Komplexes zur lysosomalen Oberfläche sowie zur Aktivierung des Komplexes über Rag GTPasen [77] [178]. Hohe intrazelluläre Leucin-Konzentrationen sind dabei essentiell für die Funktionalität des Komplexes. Leucin ist von den oben aufgeführten Aminosäuren diejenige, die am stärksten zu einer Aktivierung des mTORC1-Komplexes führt [77] [51]. Der mTORC1-Komplex führt wiederum durch eine Stimulation der Proteinbiosynthese zu einem gesteigerten Wachstum humaner Zellen und Tumorzellen. Letztere zeichnen sich durch ein starkes Wachstum aus und sind dabei in besonderem Maße von der Aktivität des mTORC1-Komplexes abhängig [77]. Eine gesteigerte Aktivität des mTORC1-Komplexes ist zugleich mit einem gesteigerten Tumorwachstum, einer stärkeren Proliferation und einer Hemmung der natürlichen Apoptose assoziiert [77].

Die Regulation der LAT1-Expression erfolgt dabei tumor- und gewebsspezifisch [178]. In Burkitt-Lymphom- und Glioblastom-Zellen unterliegt sie dem Protoonkogen c-Myc [182], das zudem auch den Glukose-Metabolismus in Tumorzellen reguliert [183]. Eine Hemmung von c-Myc führt zu einer verminderten Expression des LAT1 und in der Folge zu einer verminderten leucinvermittelten Aktivierung des mTORC1-Komplexes, wodurch die Proliferation des Burkitt-Lymphoms und des Glioblastoms reduziert wird [182]. In T-ALL-Zellen erfolgt die Regulation der LAT1-Expression unter anderem über den NOTCH-Signalweg [184]. Eine erhöhte Aktivität der NOTCH-Signalkaskaden ist dabei mit einem gesteigerten Aminosäure-Import (unter anderem Leucin) über den LAT1 assoziiert [184]. Eine Hemmung des NOTCH-Signalwegs führt wiederum zu einer verminderten leucinvermittelten Aktivierung des mTORC1 [184]. Bei Brustkrebszellen zeigt sich ebenfalls eine vermehrte Expression des LAT1 [185]. In diesen Zellen unterliegt die Expression unter anderem dem Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor-Komplex (AHR), der bei Brustkrebs konstitutiv aktiviert ist [185]. Durch eine Bindung des Komplexes an das LAT1-Gen führt er zu einer gesteigerten Transkription des Transporters [185]. Zudem spielen der LAT1 und LAT3 eine wichtige Rolle in der Entwicklung des Prostatakarzinoms. Bei androgensensitiven Prostatakarzinomen ist vor allem der LAT3 der wichtigste Transporter zur Leucin-Aufnahme, da die LAT3-Expression direkt durch Androgen reguliert wird [186]. Bei hormonresistenten Prostatakarzinomen zeigt sich jedoch eine stärkere LAT1-Expression. Die Regulation der LAT1-Expression unterliegt dabei ATF4 (Activating transcription factor 4), welcher die Transkription des Transporters reguliert [186]. Ein intrazellulärer Aminosäure-

Mangel führt über eine Aktivierung von ATF4 zu einer Hochregulation des LAT1 [186]. Sowohl der LAT1 als auch der LAT3 sind essentiell für das Wachstum und die Viabilität des Prostatakarzinoms und auch eine Rolle in der Metastasierung des Karzinoms wird beschrieben [186]. In Nierenzelltumoren konnte eine gesteigerte LAT1-Expression durch HIF2 α gezeigt werden, welches in der Promoter-Region des LAT1-Gens bindet [187]. Zudem ist eine Induktion der LAT1-Expression durch die Transkriptionsfaktoren YAP/TAZ in verschiedenen Zelllinien beschrieben [188].

Neben seiner Rolle bei verschiedenen Tumorentitäten kommt dem LAT1 jedoch auch bei verschiedenen Krankheiten eine entscheidende Bedeutung zu. Besonders stark exprimiert ist der LAT1 in der Plazenta und der Blut-Hirn-Schranke. Bei intrauteriner Wachstumsretardierung zeigt sich eine verminderte LAT1-Expression [189], was einen Risikofaktor für perinatale Komplikationen durch erniedrigte Leucin- und Phenylalanin-Konzentrationen darstellt. Eine verminderte Expression des Transporters in der Blut-Hirn-Schranke ist zudem mit der Entwicklung einer Parkinson-Erkrankung assoziiert, da unter anderem auch L-Dopa durch den LAT1 transportiert wird [190].

Ein weiterer, häufig in Tumorzellen exprimierter Transporter stellt der CAT-1 (SLC7A1) dar. Er transportiert kationische Aminosäuren wie Arginin, Lysin und Histidin. Einige Tumorentitäten (z.B. CLL-Zellen) sind auf die Aufnahme von Arginin angewiesen, da sie im Vergleich zu physiologischen Zellen Arginin nicht aus Citrullin synthetisieren können (Kapitel 2.2). Die Regulation des Transporters unterliegt dabei unter anderem der Proteinkinase C (PKC). Eine Aktivierung der PKC (vor allem der PKC α) führt zu einer Hemmung der CAT-1- und CAT-3-Proteinexpression in humanen Zellen [191] [192] [193], wobei keine direkte Interaktion zwischen der PKC und der CAT-1-Expression vermutet wird, da eine verminderte Expression auch bei fehlenden PKC-Bindungsstellen an den Transportern beobachtet wurde [191]. Die CAT-1-Expression unterliegt zudem auch der Regulation durch weitere Signalwege. An der Regulation der CAT-1-Expression sind vor allem Zytokine, Wachstumsfaktoren und Hormone beteiligt. So führte die Stimulation von Kornea-Zellen durch proinflammatorische Zytokine wie TNF α zu einer gesteigerten mRNA-Expression von CAT-1 und CAT-2b [194]. Wie zudem gezeigt werden konnte, ist der Transkriptionsfaktor NF- κ B ein positiver Regulator der CAT-1-Transkription in primären, humanen T-Lymphozyten. Eine Hemmung dieses Transkriptionsfaktors führt zu einer starken, jedoch nicht vollständigen Hemmung der mRNA-Expression des CAT-1. Ein weiterer, die CAT-1-mRNA-Expression regulierender Signalweg wird daher vermutet (Dissertation

Susanne Muther, 2017) [172]. Die genauen Regulationsmechanismen der CAT-1-Expression in physiologischen und Tumorzellen sind dabei jedoch weiterhin unklar.

Die Regulation der Expression weiterer Aminosäure-Transporter in humanen Zellen und Tumorzellen ist zurzeit noch nicht vollständig erforscht und stellt den Gegenstand zahlreicher Studien dar. In primären Prostatakarzinom-Zellen wird eine Regulation der intrazellulären Leucin-Konzentration über LAT3 beschrieben. Nach Bindung von Wachstumsfaktoren (z.B. EGF) kommt es innerhalb der Tumorzellen neben einer Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs zu einer verstärkten LAT3-Expression. Dabei wird eine direkte Regulation der LAT3-Expression durch den Wachstumsfaktor EGF beschrieben [195]. In proximalen Nierentubuluszellen zeigt sich eine verminderte γ -LAT1-Expression bei Azidose [196]. Die renale Expression des LAT2 wird unter anderem durch Aldosteron stimuliert [197].

Zur Identifizierung der Signalwege, die für die Expression des Transporters CAT-1 in humanen CLL-Zellen verantwortlich sind, wurden in dieser Arbeit drei Signalwege untersucht: der PI3K/Akt-Signalweg, der B-Zell-Rezeptor-Signalweg und der NF- κ B-Signalweg. Diese drei Signalwege sind in CLL-Zellen stark aktiviert und spielen jeweils eine entscheidende Rolle für die Proliferation und Viabilität der Zellen (Kapitel 2.4.1 bis 2.4.3).

Der PI3K/Akt-Signalweg stellt einen der zentralen Signalwege in allen Zellen des Körpers dar. Dabei ist er wesentlich an der Regulation von Wachstum und Proliferation, der Hemmung der Apoptose, der Regulation des Stoffwechsels und der Interaktion mit anderen Signalwegen verantwortlich. Zudem konnte bereits gezeigt werden, dass eine hohe Aktivität des PI3K/Akt-Signalwegs für die Proliferation und das Wachstum von CLL-Zellen entscheidend ist, da eine Hemmung des Signalwegs zu einem verminderten Zellüberleben führt [96]. Über eine Aktivierung des mTORC1-Komplexes führt Akt zu einer Aktivierung der Botenstoffe p70S6K und 4E-BP1, die an der Regulation der Proteinbiosynthese direkt beteiligt sind.

In der CLL-Zelllinie HG3 kam es durch die Hemmung des PI3K/Akt-Signalwegs zu einer Induktion der Apoptose (Kapitel 5.3.1), einer signifikanten Proliferationshemmung (Abnahme bis zu $99,0 \pm 22,3$ %) (Kapitel 5.3.2) und einer Reduktion der CAT-1-Proteinexpression (Abnahme bis zu $46,7 \pm 3,4$ %) (Kapitel 5.3.3). Eine

signifikante Reduktion der CAT-1-mRNA-Expression konnte jedoch bei Hemmung des Signalwegs nicht beobachtet werden (Kapitel 5.3.4).

Damit werden bisherige Erkenntnisse zur Rolle des PI3K/Akt-Signalwegs in CLL-Zellen bestätigt, die eine hohe Aktivität des Signalwegs als Grundlage für die Proliferation und das Wachstum von CLL-Zellen zeigten. Zudem liegt durch die Hemmung der PI3K/Akt-Signaltransduktion eine Entthemmung der Apoptose über Bcl, p53 und FoxO-Transkriptionsfaktoren nahe, wie die zunehmend schlechte Viabilität der CLL-Zellen bei Inkubation mit dem Akt-Inhibitor zeigt. Eine verminderte Proteinexpression des Aminosäure-Transporters CAT-1 könnte über eine Reduktion der Proteinbiosynthese über den mTORC1-Komplex (und im Folgenden p70S6K und 4E-BP1) erzielt werden. Diese These wird durch die fehlende Hemmung der CAT-1-mRNA-Expression durch den Akt-Inhibitor nochmals unterstützt, was auf eine posttranskriptionelle Regulation der CAT-1-Expression durch den PI3K/Akt-Signalweg hindeutet.

In den primären CLL-Zellen werden die Ergebnisse aus den Versuchen mit der CLL-Zelllinie HG3 bestätigt (Kapitel 5.7). Neben einer starken Proliferationshemmung (Abnahme: $95,0 \pm 23,2$ %) und einer Induktion der Apoptose der Zellen wird in den primären CLL-Zellen eine noch stärkere Hemmung der CAT-1-Proteinexpression beobachtet (Abnahme: $88,5 \pm 18,0$ %). Da diese Ergebnisse jedoch an nur wenigen primären CLL-Proben gewonnen wurden, müssen hier in weiteren Arbeiten deutlich mehr Patientenproben analysiert werden. Hier wäre zum Beispiel auch interessant, unterschiedliche genetische Risikogruppen der CLL hinsichtlich ihres CAT-1-Expressionsprofils bzw. der jeweiligen Expressionsregulation zu untersuchen.

Der B-Zell-Rezeptor-Signalweg (BZR-Signalweg) stellt einen weiteren, wichtigen Signalweg in B-Lymphozyten dar. Dabei ist er in Lymphozyten an fast allen Prozessen der Zelle beteiligt. Neben seiner wichtigen Funktion im Rahmen der Entwicklung von B-Lymphozyten im Knochenmark werden unter anderem die Sekretion von Antikörpern und die Einleitung der Apoptose oder Stimulation der Proliferation durch den BZR vermittelt [135]. Die durch den BZR aktivierten Signaltransduktionswege spielen eine entscheidende Rolle in der Entwicklung und Pathogenese der CLL. Wie bereits gezeigt werden konnte, ist der BZR-Signalweg der am stärksten aktivierte Signalweg in CLL-Zellen [151]. Im Rahmen der Aktivierung des BZR kommt es hierbei auch zur Aktivierung weiterer Signalwege, wie unter anderem dem PI3K/Akt-Signalweg [145] oder dem NF- κ B-Signalweg [155].

In der CLL-Zelllinie HG3 kam es durch die Hemmung des B-Zell-Rezeptor-Signalwegs zu einer leichten Induktion der Apoptose (Kapitel 5.4.1), einer Hemmung der Proliferation (Abnahme: $78,3 \pm 25,0$ %) (Kapitel 5.4.2) und einer Reduktion der CAT-1-Proteinexpression (Abnahme: $39,3 \pm 9,7$ %) (Kapitel 5.4.3). Eine Veränderung der CAT-1-mRNA-Expression konnte jedoch bei Hemmung des BZR-Signalwegs ebenfalls nicht beobachtet werden (Kapitel 5.4.4).

Der BZR-Signalweg scheint daher im Vergleich zu den anderen untersuchten Signalwegen nur eine untergeordnete Rolle in der Viabilität der CLL-Zellen zu spielen. Eine Kompensation der wichtigen über die BZR-Signaltransduktion vermittelten Prozesse innerhalb der CLL-Zellen über andere Signalwege liegt dabei nahe. Die Proliferationshemmung durch den BTK-Inhibitor kann über die Hemmung der Erk1/Erk2-Kaskade oder über eine fehlende Aktivierung des PI3K/Akt- bzw. NF- κ B-Signalwegs erfolgen. Die stärkere Hemmung der CAT-1-Proteinexpression und Proliferation durch den Akt- als durch den BTK-Inhibitor legt die Hemmung der CAT-1-Proteinexpression und Proliferation über eine fehlende Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs nahe. Durch den fehlenden Einfluss auf die CAT-1-mRNA-Expression wird ebenfalls keine transkriptionelle Regulation der CAT-1-Expression beobachtet, was daher auf eine posttranskriptionelle Regulation mit Aktivierung der Proteinbiosynthese über den PI3K/Akt-Signalweg hindeutet.

In den primären CLL-Zellen werden die Ergebnisse aus den Versuchen mit der CLL-Zelllinie HG3 bestätigt (Kapitel 5.7). Neben einer starken Proliferationshemmung (Abnahme: $59,3 \pm 17,1$ %) und einer leichten Induktion der Apoptose der Zellen wird in den primären CLL-Zellen ebenfalls eine Hemmung der CAT-1-Proteinexpression beobachtet (Abnahme: $36,3 \pm 0,3$ %).

Ein weiterer, in allen Zelltypen des Menschen vorkommender Signalweg ist der NF κ B-Signalweg, der vor allem im Rahmen der Immunabwehr, bei Entzündungen oder bei akuten Stressreaktionen aktiviert wird. Die NF- κ B-Transkriptionsfaktoren führen zur Transkription zahlreicher verschiedener Gene, die vor allem mit einer Stimulation der Zellproliferation bei gleichzeitiger Hemmung der Apoptose assoziiert sind [99]. Zudem zeigen auch viele Tumorentitäten eine dauerhaft gesteigerte Aktivität des NF κ B-Signalwegs [100] [101] [102]. Dazu zählt unter anderem auch die CLL, bei welcher der Signalweg eine Rolle im Fortschreiten der Erkrankung zu spielen scheint [123].

In der CLL-Zelllinie HG3 kam es durch die Hemmung des NF- κ B-Signalwegs zu einer Induktion der Apoptose (Kapitel 5.5.1) und einer starken Hemmung der Proliferation

(Abnahme: $99,9 \pm 27,6$ %) (Kapitel 5.5.2). Ein Einfluss auf die CAT-1-Protein- oder Genexpression konnte bei Inkubation mit dem NF- κ B-Inhibitor jedoch nicht beobachtet werden (Kapitel 5.5.4, Kapitel 5.5.5).

Dem NF- κ B-Signalweg kommt bei der CLL daher eine besondere Bedeutung in der Proliferation und der Viabilität der Zellen zu. Dies bestätigt bisherige Erkenntnisse über den Signalweg, die eine Induktion der Proliferation mit gleichzeitiger Hemmung der Apoptose postulieren [99]. Durch den NF- κ B-Inhibitor wird die Proliferation stark gehemmt und die Apoptose der CLL-Zellen induziert. Dabei scheint der Signalweg jedoch keinen Einfluss auf die Expression des Aminosäure-Transporters CAT-1 zu haben.

In den drei untersuchten CLL-Patientenproben zeigten sich unterschiedliche Wirkungen des NF- κ B-Inhibitors auf die primären CLL-Zellen. Wie bereits in den Versuchen mit der CLL-Zelllinie gezeigt werden konnte, führte eine Inhibition des Signalwegs zu einer starken Proliferationshemmung (Abnahme: $72,1 \pm 28,5$ %) der primären CLL-Zellen. Zudem kam es bei Inkubation mit dem NF- κ B-Inhibitor zu einer deutlichen Zunahme toter Zellen (Zunahme: $35,0 \pm 18,4$ %), wobei sich die drei CLL-Patientenproben in der Hemmung der Viabilität bei Inkubation mit dem Inhibitor deutlich unterschieden. Zuletzt zeigten sich auch deutliche Unterschiede in der CAT-1-Proteinexpression (Abnahme: $81,8 \pm 32,1$ %) bei Inkubation mit dem NF- κ B-Inhibitor. Eine unterschiedlich stark ausgeprägte Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs bei verschiedenen Subtypen der CLL könnte eine Begründung für die verschiedenen Ergebnisse darstellen. Eine Aussage über die Signifikanz der Ergebnisse ist wiederum durch die sehr eingeschränkte Anzahl an Patienten-Proben nicht möglich.

Eine Interaktion zwischen dem BZR-, dem PI3K/Akt- und dem NF- κ B-Signalweg ist bereits bekannt. Der BZR-Signalweg stellt dabei den am stärksten aktivierten Signalweg in CLL-Zellen dar, während der PI3K/Akt- und der NF- κ B-Signalweg ebenfalls eine hohe Aktivität zeigen. Die genauen Interaktionen zwischen den Signalwegen im Rahmen der Proliferation und Viabilität sowie der Proteinbiosynthese der CLL-Zellen sind dabei noch unklar. Durch die Kombination der Inhibitoren sollten mögliche additive Effekte auf die Hemmung der CAT-1-Expression sowie der Proliferation untersucht werden.

Jegliche Kombinationen der Inhibitoren führten sowohl in der CLL-Zelllinie HG3 als auch in den primären CLL-Zellen zu einer starken Induktion der Apoptose. Dabei waren zum Teil mehr als 50 % der Zellen nach einer Inkubationszeit von 24 bzw.

48 Stunden tot, was eine kritische Betrachtung der Proliferationshemmung und der CAT-1-Expression erfordert. Durch die Kombination der Inhibitoren kam es sowohl in der CLL-Zelllinie HG3 als auch in den primären CLL-Zellen zu einer (fast) vollständigen Hemmung der Proliferation der CLL-Zellen. Während sowohl der Akt- als auch der BTK-Inhibitor einzeln zu einer signifikanten Hemmung der CAT-1-Proteinexpression führten, zeigte die Kombination der Inhibitoren keine signifikante Reduktion der CAT-1-Expression in der CLL-Zelllinie HG3. Gleiches galt auch für die restlichen Kombinationen der Inhibitoren. Die (im Vergleich zu der Inkubation mit einem einzelnen Inhibitor) zum Teil nicht signifikante Zunahme der CAT-1-Expression ist gegebenenfalls auf die signifikante Hemmung der Viabilität bei Kombination der Inhibitoren zurückzuführen. Dabei kann ein verstärkter Einbau des Transporters zur Aufnahme der für das Wachstum, die Proliferation und die Viabilität der Zellen benötigten Aminosäure Arginin bei schlechter Viabilität der CLL-Zellen diskutiert werden.

Durch die Verwendung lediglich einer DMSO-Kontrolle (entsprechend der maximal eingesetzten DMSO-Menge bei Kombination der Inhibitoren) konnten die Ergebnisse aus den Versuchen mit dem Akt- und BTK-Inhibitor (Kapitel 5.3, Kapitel 5.4) in den Kombinationsversuchen nicht bestätigt werden. Es zeigte sich lediglich eine leichte, jedoch nicht signifikante Reduktion der CAT-1-Expression. Die fehlende Signifikanz kann in diesem Fall durch die zum Teil signifikante Reduktion der CAT-1-Expression durch DMSO begründet werden. Zudem konnte mit zunehmender DMSO-Konzentration eine leichte Hemmung der Proliferation der HG3-Zellen beobachtet werden, während DMSO keinen Effekt auf die Viabilität der Zellen zeigte.

Um die Effekte der Inhibitoren auf die CAT-1-Expression bei den Versuchen mit den primären CLL-Zellen differenziert betrachten zu können, wurden daher mehrere DMSO-Kontrollen (entsprechend der DMSO-Mengen der jeweils eingesetzten Inhibitoren) dem Versuchsansatz hinzugefügt. Dabei kam es in den primären CLL-Zellen (im Gegensatz zur CLL-Zelllinie HG3) zu einer additiven Hemmung der CAT-1-Proteinexpression (Abnahme bei Akt- + BTK-Inhibitor: $96,2 \pm 7,3$ %, Abnahme bei Akt- + NF- κ B-Inhibitor: $96,9 \pm 6,0$ %, Abnahme bei BTK- + NF- κ B-Inhibitor: $91,9 \pm 15,4$ %).

6.3 Bedeutung der Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung von Signalwegen, die in humanen CLL-Zellen für die Expression des Aminosäure-Transporters CAT-1 verantwortlich sind. Die dabei gewonnenen Erkenntnisse stellen einen ersten, zum Teil vielversprechenden Ansatz dar. Vor allem in den primären CLL-Zellen zeigte sich durch den Akt- und BTK-Inhibitor (sowohl als Monosubstanzen als auch in Kombination) eine starke Reduktion der CAT-1-Proteinexpression bei gleichzeitiger starker Hemmung der Proliferation der CLL-Zellen und Induktion der Apoptose. Der PI3K/Akt- und der B-Zell-Rezeptor-Signalweg scheinen daher eine Rolle in der CAT-1-Proteinexpression zu spielen, wobei durch die Hemmung des PI3K/Akt-Signalwegs noch stärkere Effekte erzielt werden konnten. Diese Ergebnisse zeigten sich (etwas schwächer ausgeprägt) auch in der CLL-Zelllinie HG3. Eine überwiegend posttranskriptionelle Regulation wird dabei vermutet, da eine Hemmung der Signalwege lediglich zu einer Reduktion der CAT-1-Proteinexpression, nicht jedoch zu einer Reduktion der mRNA-Expression führte. Die Regulation der verschiedenen Aminosäuretransporter ist und bleibt Gegenstand zahlreicher Studien, wobei die genauen intrazellulären Mechanismen dabei häufig noch unklar sind. Diese Arbeit knüpft damit an bisherige Erkenntnisse zur Regulation von Aminosäuretransportern in humanen Zellen und Tumorzellen an.

6.4 Ausblick

Um weitere Aussagen über die Signifikanz der CAT-1-Proteinexpressionshemmung in den primären CLL-Zellen treffen zu können, bedarf es der Fortführung der Experimente mit einer größeren CLL-Patientenstichprobe. Gegebenenfalls können dabei auch individuell unterschiedliche Effekte der Inhibitoren bei unterschiedlichen CLL-Subtypen untersucht werden. Durch die Möglichkeit der Induktion des CAT-1-Transporters in primären CLL-Zellen lassen sich im Vergleich zur CLL-Zelllinie HG3 besser Effekte der Inhibitoren untersuchen.

Zudem kann durch die Verwendung weiterer Signalweginhibitoren, die an Akt oder BTK nachfolgende Signalmoleküle ansetzen, eine spezifischere Hemmung der CAT-1-Expression sowie der Proliferation und Viabilität der CLL-Zellen untersucht werden. Vor allem die Hemmung des mTORC1-Komplexes, der durch Akt aktiviert wird und dem eine entscheidende Rolle in der Regulation der Proteinbiosynthese zukommt, stellt dabei einen interessanten Angriffspunkt dar. Darüber hinaus kann auch der Einfluss weiterer Signalwege auf die CAT-1-Expression durch die

Verwendung anderer Inhibitoren (z.B. Inhibition des MAPK/ERK-Signalwegs) untersucht werden.

Ein weiteres Ziel sollte die Durchführung der Experimente mit einer zweiten CLL-Zelllinie sein. Wie zu Beginn meiner Versuche gezeigt werden konnte, sind oben genannte Signalwege im Vergleich zu den anderen Zelllinien auch in der CLL-Zelllinie JVM-2 stark aktiviert.

Zuletzt könnte untersucht werden, ob eine Inkubation der HG3- und primären CLL-Zellen in Argininmangelmedium zu einer stärkeren Reduktion der CAT-1-Proteinexpression bei Hemmung der verschiedenen Signalwege führt. Wie Vorversuche gezeigt hatten, führte ein Argininmangel zu einer Induktion des Transporters (Kapitel 5.2).

7 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit stellte die Identifizierung von Signalwegen in CLL-Zellen dar, die für die Expression des kationischen Aminosäure-Transporters CAT-1 verantwortlich sind. CLL-Zellen sind auf die Aufnahme von Arginin aus dem Extrazellularraum angewiesen, da sie intrazellulär aufgrund einer fehlenden Expression des Enzyms ASS Arginin aus Citrullin nicht synthetisieren können. Dieser Arginin-Import erfolgt in CLL-Zellen ausschließlich über den Transporter CAT-1. Neben einer möglichen pharmakologischen Hemmung des CAT-1 stellt die Identifizierung der für die Expression des Transporters verantwortlichen Signalwege eine neue potentielle Zielstruktur in der Therapie der CLL dar.

Es wurden drei wichtige Signalwege in CLL-Zellen untersucht: Der PI3K/Akt-Signalweg, der B-Zell-Rezeptor-Signalweg und der NF- κ B-Signalweg. In der CLL-Zelllinie HG3 führte eine Inhibition des PI3K/Akt-Signalwegs korrelierend zu einer starken Proliferationshemmung (Abnahme: $99,0 \pm 22,3$ %) sowie zu einer signifikanten Inhibition der CAT-1-Proteinexpression (Abnahme: $46,7 \pm 3,4$ %), ohne dass eine transkriptionelle Regulation nachweisbar war. Auch bei Hemmung der BTK fand sich im gleichen Zeitintervall eine signifikante Reduktion der CAT-1-Proteinexpression (Abnahme: $39,3 \pm 9,7$ %), wiederum ohne nachweisbare Reduktion der CAT-1-mRNA-Expression. Die Proliferation der HG3-Zellen war durch die BTK-Inhibition ebenfalls signifikant reduziert (Abnahme: $78,3 \pm 25,0$ %). Im Gegensatz zur Akt- und BTK-Hemmung hatte eine pharmakologische Inhibition des NF- κ B-Signalwegs im Zeitraum von 6 bis 96 Stunden weder einen Einfluss auf die CAT-1-Proteinexpression noch auf die CAT-1-Genexpression, obgleich die Proliferation der HG3-Zellen durch den NF- κ B-Inhibitor nahezu vollständig inhibiert wurde (Abnahme: $99,9 \pm 27,6$ %). Bei Kombination des Akt- und BTK-Inhibitors zeigte sich keine zusätzliche Reduktion der Protein- oder mRNA-Expression von CAT-1. Auch die weiteren Kombinationen (Akt- und NF- κ B-Inhibitor, BTK- und NF- κ B-Inhibitor) zeigten ebenfalls keine zusätzliche Inhibition der CAT-1-Expression, obgleich die Kombination der Inhibitoren eine vollständige Proliferationshemmung der HG3-Zellen induzierte.

In primären CLL-Zellen führte die Inhibition des PI3K/Akt-Signalwegs zu einer deutlichen Reduktion der Proliferation (Abnahme: $95,0 \pm 23,2$ %) und CAT-1-Proteinexpression (Abnahme: $88,5 \pm 18,0$ %) bei gleichzeitiger Hemmung der Viabilität. Durch die Hemmung des BZR-Signalwegs konnte ebenfalls eine Reduktion der Proliferation (Abnahme: $59,3 \pm 17,1$ %) und Hemmung der CAT-1-

Proteinexpression (Abnahme: $36,3 \pm 0,3$ %) erzielt werden. Zuletzt zeigte auch die Hemmung des NF- κ B-Signalwegs eine deutliche Reduktion der Proliferation (Abnahme: $72,1 \pm 28,5$ %) und der CAT-1-Proteinexpression (Abnahme: $81,8 \pm 32,1$ %). Die Kombination der einzelnen Inhibitoren (Akt- + BTK-Inhibitor, Akt- + NF- κ B-Inhibitor, BTK- + NF- κ B-Inhibitor) führten zu einer fast vollständigen Proliferationshemmung und Hemmung der CAT-1-Proteinexpression.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Promotionsarbeit erstmals einen Zusammenhang zwischen der Aktivierung definierter wichtiger Signaltransduktionswege (vor allem über Akt und BTK) und der Expression des Arginintransporters CAT-1 in CLL-Zellen. Diese Ergebnisse bilden die Grundlage für weitergehende und umfangreiche Analysen an einem größeren Kollektiv von CLL-Patienten. Der Einsatz zielgerichteter Substanzen, welche inhibitorisch in CLL-Signalwege eingreifen, hat die Behandlung dieser bis dato immer noch unheilbaren Erkrankung bereits revolutioniert. Die Ergebnisse dieser Promotionsarbeit unterstützen die Hypothese, dass die Wirksamkeit derartiger Signaltransduktionshemmer unter anderem auch auf einer konsekutiven Inhibition der Expression wichtiger Nährstofftransporter, wie hier für den CAT-1-Transporter gezeigt, beruhen kann.

8 Literaturverzeichnis

- [1] N. N. Pavlova und C. B. Thompson. The emerging hallmarks of cancer metabolism. *Cell Metab.* Bd. 23(1): pp. 27-47. 2016.
- [2] U. E. Martinez-Outschoorn, M. Peiris-Pages, R. G. Pestell, F. Sotgia und M. P. Lisanti. Cancer metabolism: a therapeutic perspective. *Nat Rev Clin Oncol.* Bd. 14(1): pp. 11-31. 2017.
- [3] M. Wetzler, B. L. Sanford, J. Kurtzberg, et al. Effective asparagine depletion with pegylated asparaginase results in improved outcomes in adult lymphoblastic leukemia: Cancer and Leukemia Group B Study 9511. *Blood.* Bd. 109: pp. 4164-4167. 2007.
- [4] S. L. Cramer, A. Saha, J. Liu, et al. Systemic depletion of L-cyst(e)ine with cyst(e)inase increases reactive oxygen species and suppresses tumor growth. *Nat Med.* Bd. 23(1): pp. 120-127. 2017.
- [5] A. N. McCracken und A. L. Edinger. Nutrient transporters: the Achilles' heel of anabolism. *Trends Endocrinol Metab.* Bd. 24(4): pp. 200-208. 2013.
- [6] A. M. Hosios, V. C. Hecht, L. V. Danai, et al. Amino acids rather than glucose account for the majority of cell mass in proliferating mammalian cells. *Dev Cell.* Bd. 36(5): pp. 540-549. 2016.
- [7] F. Mussai, S. Egan, J. Higginbotham-Jones, et al. Arginine dependence of acute myeloid leukemia blast proliferation: a novel therapeutic target. *Blood.* Bd. 125(15): pp. 2386-2396. 2015.
- [8] C. De Santo, S. Booth, A. Vardon, et al. The arginine metabolome in acute lymphoblastic leukemia can be targeted by the pegylated-recombinant arginase I BCT-100. *Int J Cancer.* Bd. 142(7): pp. 1490-1502. 2017.
- [9] M. M. Philipps, M. T. Sheaff und P. W. Szlosarek. Targeting arginine-dependent cancers with arginine-degrading enzymes: opportunities and challenges. *Cancer Res Treat.* Bd. 45(4): pp. 251-262. 2013.
- [10] A. Werner, D. Pieh, H. Echchannaoui, J. Rupp, K. Rajalingam, M. Theobald, E. I. Closs und M. Munder. Cationic amino acid transporter-1-mediated arginine uptake is essential for chronic lymphocytic leukemia cell proliferation and viability. *Front Oncol.* Bd. 9: p. 1268. 20 November 2019.
- [11] P. W. Szlosarek, J. P. Steele, L. Nolan, et al. Arginine deprivation with pegylated arginine deiminase in patients with argininosuccinat synthetase 1-deficient malignant pleural mesothelioma: A randomized clinical trial. *JAMA Oncol.* Bd. 3(1): pp. 58-66. 2017.
- [12] H.-J. Tsai, S. S. Jiang, W.-C. Hung, et al. A phase II study of arginine deiminase (ADI-PEG20) in relapsed/refractory or poor-risk acute myeloid leukemia patients. *Sci Rep.* Bd. 7(1): p. 11253. 2017.
- [13] T. Yau, P. N. Cheng, P. Chan, et al. A phase 1 dose-escalating study of pegylated recombinant human arginase 1 (Peg-rhArg1) in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Invest New Drugs.* Bd. 31(1): pp. 99-107. 2013.
- [14] C.-M. Wendtner, P. Dreger, B. Eichhorst, M. Gregor, R. Greil, M. Hallek, et al. Onkopedia. September 2020. [Online]. Available: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/chronische-lymphatische-leukaemie-cll/@@guideline/html/index.html>. [Zugriff am Dezember 2020].

- [15] S. Molica. Sex differences in incidence and outcome of chronic lymphocytic leukemia patients. *Leuk Lymphoma*. Bd. 47(8): pp. 1477-1480. 2006.
- [16] A. Lenartova, T. B. Johannesen und G. E. Tjonnfjord. National trends in incidence and survival of chronic lymphocytic leukemia in Norway for 1953-2012: a systematic analysis of population-based data. *Cancer Med*. Bd. 5(12): pp. 3588-3595. 2016.
- [17] C. Rozman und E. Montserrat. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. Bd. 333(16): pp. 1052-1057. 1995.
- [18] A. C. Rawstron, F. L. Bennett, S. J. M. O'Connor, et al. Monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. Bd. 359(6): pp. 575-583. 2008.
- [19] J. L. Binet, A. Auquier, G. Dighiero, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*. Bd. 48(1): pp. 198-204. 1981.
- [20] G. A. Calin, C. D. Dumitru, M. Shimizu, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sc U S A*. Bd. 99(24): pp. 15524-15529. 2002.
- [21] A. K. Ghosh und N. E. Kay. Critical signal transduction pathways in CLL. *Adv Exp Med Biol*. Bd. 792: pp. 215-329. 2013.
- [22] M. Hallek, B. D. Cheson, D. Catovsky, et al. IWCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood*. Bd. 131(25): pp. 2745-2760. 2018.
- [23] M. Hallek, T. D. Shanafelt und B. Eichhorst. Chronic lymphocytic leukemia. *Lancet*. Bd. 391(10129): pp. 1524-1537. 2018.
- [24] P. Dreger, J. Schetelig, N. Andersen, et al. Managing high-risk CLL during transition to a new treatment era: stem cell transplantation or novel agents? *Blood*. Bd. 124(26): pp. 3841-3849. 2014.
- [25] J. Parkin und B. Cohen. An overview of the immune system. *Lancet*. Bd. 357(9270): pp. 1777-1789. 2010.
- [26] J. E. Smith-Garvin, G. A. Koretzky und M. S. Jordan. T Cell Activation. *Annu Rev Immunol*. Bd. 27: pp. 591-619. 2010.
- [27] A. Werner, M. Koschke, N. Leuchtner, C. Luckner-Minden, A. Habermeier, J. Rupp, C. Heinrich, R. Conradi, E. I. Closs und M. Munder. Reconstitution of T cell proliferation under arginine limitation: activated human T cells take up citrulline via L-type amino acid transporter 1 and use it to regenerate arginine after induction of argininosuccinate synthase expression. *Front Immunol*. Bd. 8: p. 864. 2017.
- [28] S. M. Morris Jr. Arginine metabolism: boundaries of our knowledge. *J Nutr*. Bd. 137(6): pp. 1602S-1609S. 2007.
- [29] G. Wu und S. M. Morris Jr. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J*. Bd. 336(1): pp. 1-17. 1998.
- [30] K. A. Wijnands, T. M. Castermans, M. P. Hommen, et al. Arginine and citrulline and the immune response in sepsis. *Nutrients*. Bd. 7(3): pp. 1426-1463. 2015.
- [31] N. E. Flynn, C. J. Meininger, T. E. Haynes und G. Wu. The metabolic basis of arginine nutrition and pharmacotherapy. *Biomed Pharmacother*. Bd. 56(9): pp. 427-438. 2002.
- [32] V. Bansal und J. B. Ochoa. Arginine availability, arginase, and the immune response. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. Bd. 6(2): pp. 223-228. 2003.

- [33] E. I. Closs, J.-P. Boissel, A. Habermeier und A. Rotmann. Structure and function of cationic amino acid transporters (CATs). *J Membr Biol.* Bd. 213(2): pp. 67-77. 2006.
- [34] M. Munder. Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system. *Br J Pharmacol.* Bd. 158(3): pp. 638-651. 2009.
- [35] B. Delage, D. A. Fennell, L. Nicholson, I. McNeish, N. R. Lemoine, T. Crook und P. W. Szlosarek. Arginine deprivation and argininosuccinate synthetase expression in the treatment of cancer. *Int J Canc.* Bd. 126(12): pp. 2762-2772. 2010.
- [36] W. J. De Jonge, M. C. Lamers, W. H. Lamers, et al. Arginine deficiency affects early B cell maturation and lymphoid organ development in transgenic mice. *J Clin Invest.* Bd. 110(10): pp. 1539-1548. 2002.
- [37] W. Wang und W. Zou. Amino acids and their transporters in T cell immunity and cancer therapy. *Mol Cell.* Bd. 80(3): pp. 384-395. 2020.
- [38] R. Geiger, J. C. Rieckmann, T. Wolf, et al. L-arginine modulates T cell metabolism and enhances survival and anti-tumor activity. *Cell.* Bd. 167(3): pp. 829-842. 2016.
- [39] V. L. Albaugh, C. Pinzon-Guzman und A. Barbul. Arginine-dual roles as an onconutrient and immunonutrient. *J Surg Oncol.* Bd. 115(3): pp. 273-280. 2017.
- [40] P. Li, Y.-L. Yin, S. W. Kim, et al. Amino acids and immune function. *Br J Nutr.* Bd. 98(2): pp. 237-252. 2007.
- [41] N. Feldmeyer, G. Wabnitz, M. Munder, et al. Arginine deficiency leads to impaired cofilin dephosphorylation in activated human T lymphocytes. *Int Immunol.* Bd. 24(5): pp. 303-313. 2012.
- [42] J. B. Hibbs Jr., R. R. Taintor und Z. Vavrin. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science.* Bd. 235(4787): pp. 473-476. 1987.
- [43] P. C. Rodriguez, A. H. Zea, J. DeSalvo, et al. L-arginine consumption by macrophages modulates the expression of CD3 zeta chain in T lymphocytes. *J Immunol.* Bd. 171(3): pp. 1232-1239. 2003.
- [44] M. Scalise, L. Console, F. Rovella, et al. Membrane transporters for amino acids as players of cancer metabolic rewiring. *Cells.* Bd. 9(9): p. 2028. 2020.
- [45] F. Mussai, S. Egan, S. Hunter, et al. Neuroblastoma arginase activity creates an immunosuppressive microenvironment that impairs autologous and engineered immunity. *Cancer Research.* Bd. 75(15): pp. 3043-3053. 2015.
- [46] S. Zou, X. Wang, P. Liu, et al. Arginine metabolism and deprivation in cancer therapy. *Biomed Pharmacother.* Bd. 118: p. 109210. 2019.
- [47] L. J. Nicholson, P. R. Smith, L. Hiller, et al. Epigenetic silencing of argininosuccinate synthetase confers resistance to platinum-induced cell death but collateral sensitivity to arginine auxotrophy in ovarian cancer. *Int J Cancer.* Bd. 125(6): pp. 1454-1463. 2009.
- [48] U. Krummrei, E.-E. Baulieu und B. Chambraud. The FKBP-associated protein FAP48 is an antiproliferative molecule and a player in T cell activation that increases IL2 synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* Bd. 100(5): pp. 2444-2449. 2003.
- [49] Y.-S. Shan, H.-P. Hsu, M.-D. Lai, et al. Increased expression of argininosuccinate synthetase protein predicts poor prognosis in human gastric cancer. *Oncol Rep.* Bd. 33(1): pp. 49-57. 2015.
- [50] H. Al-Koussa, N. El Mais, H. Maalouf, et al. Arginine deprivation: a potential therapeutic for cancer cell metastasis? A review. *Cancer Cell Int.* Bd. 20: p. 150. 2020.

- [51] M. D. Pizzagalli, A. Bensimon und G. Superti-Furga. A guide to plasma membrane solute carrier proteins. *FEBS J.* 2020. doi: 10.1111/febs.15531.
- [52] A. Cesar-Razquin, B. Snijder, T. Frappier-Brinton, et al. A call for systematic research on solute carriers. *Cell.* Bd. 162(3): pp. 478-487. 2015.
- [53] I. A. Hansen, D. Y. Boudko, S.-H. Shiao, et al. AaCAT1 of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*: a novel histidine-specific amino acid transporter from the SCL7 family. *J Biol Chem.* Bd. 286(12): pp. 10803-10813. 2011.
- [54] D. Fotiadis, Y. Kanai und M. Palacin. The SCL3 and SLC7 families of amino acid transporters. *Mol Aspects Med.* Bd. 34(2-3): pp. 139-158. 2013.
- [55] D. Dickens, S. D. Webb, S. Antonyuk, et al. Transport of gabapentin by LAT1 (SLC7A5). *Biochem Pharmacol.* Bd. 85(11): pp. 1672-1683. 2013.
- [56] H. Uchino, Y. Kanai, D. K. Kim, et al. Transport of amino acid-related compounds mediated by L-type amino acid transporter 1 (LAT1): insights into the mechanisms of substrate recognition. *Mol Pharmacol.* Bd. 61(4): pp. 729-737. 2002.
- [57] R. J. Boado, J. Y. Li, M. Nagaya, C. Zhang und W. M. Pardridge. Selective expression of the large neutral amino acid transporter at the blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Bd. 96(21): pp. 12079-12084. 1999.
- [58] L. V. Sinclair, J. Rolf, E. Emslie, et al. Control of amino-acid transport by antigen receptors coordinates the metabolic reprogramming essential for T cell differentiation. *Nat Immunol.* Bd. 14(5): pp. 500-508. 2013.
- [59] Y. Zhao, L. Wang und J. Pan. The role of L-type amino acid transporter 1 in human tumors. *Intractable Rare Dis Res.* Bd. 4(4): pp. 165-169. 2015.
- [60] K. Takeuchi, S. Ogata, K. Nakanishi, et al. LAT1 expression in non-small-cell lung carcinomas: analyses by semiquantitative reverse transcription-PCR (237 cases) and immunohistochemistry (295 cases). *Lung Cancer.* Bd. 68(1): pp. 58-65. 2010.
- [61] M. Furuya, J. Horiguchi, H. Nakajima, et al. Correlation of L-type amino acid transporter 1 and CD98 expression with triple negative breast cancer prognosis. *Cancer Sci.* Bd. 103(2): pp. 382-389. 2012.
- [62] N. Yanagisawa, T. Satoh, K. Hana, et al. L-amino acid transporter 1 may be a prognostic marker for local progression of prostatic cancer under expectant management. *Cancer Biomark.* Bd. 15(4): pp. 365-374. 2015.
- [63] Y. Cormerais, S. Guiliano, R. LeFloch, et al. Genetic disruption of the multifunctional CD98/LAT1 complex demonstrates the key role of essential amino acid transport in the control of mTORC1 and tumor growth. *Cancer Res.* Bd. 76(15): pp. 4481-4492. 2016.
- [64] R. Deves und C. A. Boyd. Transporters for cationic amino acids in animal cells: discovery, structure and function. *Physiol Rev.* Bd. 78(2): pp. 487-545. 1998.
- [65] E. I. Closs, P. Gräf, A. Habermeier, J. M. Cunningham und U. Förstermann. Human cationic amino acid transporters hCAT-1, hCAT-2A, and hCAT-2B: three related carriers with distinct transport properties. *Biochemistry.* Bd. 36(21): pp. 6462-6468. 1997.
- [66] C. P. Perkins, V. Mar, J. R. Shutter, et al. Anemia and perinatal death result from loss of the murine ecotropic retrovirusreceptor mCAT-1. *Genes Dev.* Bd. 11(7): pp. 914-925. 1997.
- [67] M. Hatzoglou, J. Fernandez, I. Yaman und E. I. Closs. Regulation of cationic amino acid transport: the story of the CAT-1 transporter. *Annu Rev Nutr.* Bd. 24: pp. 377-399. 2004.

- [68] S. N. Bhattacharyya, R. Habermacher, U. Martine, E. I. Closs und W. Filipowicz. Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell*. Bd. 125(6): pp. 1111-1124. 2006.
- [69] B. D. Manning und L. C. Cantley. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*. Bd. 129(7): pp. 1261-1274. 2007.
- [70] B. D. Manning und A. Toker. AKT/PKB signaling: navigating the network. *Cell*. Bd. 169(3): pp. 381-405. 2017.
- [71] L. M. Thorpe, H. Yuzugullu und J. J. Zhao. PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. *Nat Rev Cancer*. Bd. 15(1): pp. 7-24. 2015.
- [72] G. M. Nitulescu, M. Van de Venter, G. Nitulescu, et al. The Akt pathway in oncology therapy and beyond. *Int J Oncol*. Bd. 53(6): pp. 2319-2331. 2018.
- [73] G. Song, G. Ouyang und S. Bao. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med*. Bd. 9(1): pp. 59-71. 2005.
- [74] G. Risso, M. Blaustein, B. Pozzi, et al. Akt/PKB: one kinase, many modifications. *Biochem J*. Bd. 468(2): pp. 203-214. 2015.
- [75] D. R. Alessi, M. Andjelkovic, B. Caudwell, et al. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J*. Bd. 15(23): pp. 6541-6551. 1996.
- [76] V. M. Jansen, I. A. Mayer und C. L. Arteaga. Clinical Cancer Research. 2016. [Online]. Available: <https://clincancerres.aacrjournals.org/content/22/11/2599>. [Zugriff am 2019].
- [77] R. A. Saxton und D. M. Sabatini. mTOR Signaling in growth, metabolism, and disease. *Cell*. Bd. 168(6): pp. 960-976. 2017.
- [78] C. J. Potter, L. G. Pedraza und T. Xu. Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2. *Nat Cell Biol*. Bd. 4(9): pp. 658-665. 2002.
- [79] D. A. Cross, D. R. Alessi, P. Cohen, et al. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*. Bd. 378(6559): pp. 785-789. 1995.
- [80] C. Morel, S. M. Carlson, F. M. White und R. J. Davis. Mcl-1 integrates the opposing actions of signaling pathways that mediate survival and apoptosis. *Mol Cell Biol*. Bd. 29(14): pp. 3845-3852. 2009.
- [81] R. Sears, F. Nuckolis, E. Haura, et al. Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. *Genes Dev*. Bd. 14(19): pp. 2501-2514. 2000.
- [82] A. Brunet, A. Bonni, M. J. Zigmond, et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a forkhead transcription factor. *Cell*. Bd. 96(6): pp. 857-868. 1999.
- [83] K. E. van der Vos und P. J. Coffey. The extending network of FOXO transcriptional target genes. *Antioxid Redox Signal*. Bd. 14(4): pp. 579-592. 2011.
- [84] L. Novellademunt, I. Tato, A. Navarro-Sabate, et al. Akt-dependent activation of the heart 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFKFB2) isoenzyme by amino acids. *J Biol Chem*. Bd. 288(15): pp. 10640-10651. 2013.
- [85] A. R. Hussain, S. O. Ahmed, M. Ahmed, et al. Cross-Talk between NFkB and the PI3-Kinase/AKT Pathway can be targeted in primary effusion lymphoma (PEL) cell lines for efficient apoptosis. *PLoS One*. Bd. 7(6). 2012.
- [86] M. C. Mendoza, E. Emrah Er und J. Blenis. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends Biochem Sci*. Bd. 36(6): pp. 320-328. 2011.

- [87] S. A. Hawley, F. A. Ross und G. J. Gowans. Phosphorylation by Akt within the ST loop of AMPK- α 1 down-regulates its activation in tumour cells. *Biochem. Bd.* 459(2): pp. 275-287. 2014.
- [88] H. J. Lim, P. Crowe und J.-L. Yang. Current clinical regulation of PI3K/PTEN/Akt/mTOR signalling in treatment of human cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* Bd. 141(4): pp. 671-689. 2015.
- [89] N. Haddadi, Y. Lin, G. Travis, et al. PTEN/PTENP1: "Regulating the regulator of RTK-dependent PI3K/Akt signalling", new targets for cancer therapy. *Mol Cancer.* Bd. 17(1): p. 37. 2018.
- [90] J. Brognard, E. Sierrecki, T. Gao und A. C. Newton. PHLPP and a second isoform, PHLPP2, differentially attenuate the amplitude of Akt signaling by regulating distinct Akt isoforms. *Mol Cell.* Bd. 25(6): pp. 917-931. 2007.
- [91] J. A. Engelman. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer.* Bd. 9(8): pp. 550-562. 2009.
- [92] I. A. Mayer und C. L. Arteaga. The PI3K/Akt pathway as a target for cancer treatment. *Annu Rev Med.* Bd. 67: pp. 11-28. 2016.
- [93] N. Chalhoub und S. J. Baker. PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annu Rev Pathol.* Bd. 4: pp. 127-150. 2009.
- [94] J. D. Carpten, A. L. Faber, C. Horn, et al. A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature.* Bd. 448(7152): pp. 439-444. 2007.
- [95] S. Dasari und P. B. Tchounwou. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol.* Bd. 740: pp. 364-378. 2014.
- [96] I. Ringshausen, F. Schneller, C. Bogner, et al. Constitutively activated phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K) is involved in the defect of apoptosis in B-CLL: association with protein kinase C δ . *Blood.* Bd. 100(10): pp. 3741-3748. 2002.
- [97] A. Sakai, C. Thieblemont, A. Wellmann, et al. PTEN gene alterations in lymphoid neoplasms. *Blood.* Bd. 92(9): pp. 3410-3415. 1998.
- [98] A. Schrader, W. Popal, N. Lilienthal, et al. AKT-pathway inhibition in chronic lymphocytic leukemia reveals response relationships defined by TCL1. *Curr Cancer Drug Targets.* Bd. 14(8): pp. 700-712. 2014.
- [99] M. Karin und Y. Ben-Neriah. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-(κ)B activity. *Annu Rev Immunol.* Bd. 18: pp. 621-663. 2000.
- [100] U. Kordes, D. Krappmann, V. Heissmeyer, et al. Transcription factor NF- κ B is constitutively activated in acute lymphoblastic leukemia cells. *Leukemia.* Bd. 14(3): pp. 399-402. 2000.
- [101] R. C. Bargou, F. Emmerich, D. Krappmann, et al. Constitutive nuclear factor- κ B-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *J Clin Invest.* Bd. 100(12): pp. 2961-2969. 1997.
- [102] R. Feinman, D. S. Siegel und J. Berenson. Regulation of NF- κ B in multiple myeloma: therapeutic implications. *Clin Adv Hematol Oncol.* Bd. 2(3): pp. 162-166. 2004.
- [103] R. Sen und D. Baltimore. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF- κ B by a posttranslational mechanism. *Cell.* Bd. 47(6): pp. 921-928. 1986.
- [104] U. Siebenlist, G. Franzoso und K. Brown. Structure, regulation and function of NF- κ B. *Annu Rev Cell Biol.* Bd. 10: pp. 405-455. 1994.

- [105] S. T. Whiteside und A. Israel. I κ B proteins: structure, function and regulation. *Semin Cancer Biol.* Bd. 8(2): pp. 75-82. 1997.
- [106] F. Arenzana-Seisdedos, P. Turpin, M. Rodriguez, et al. Nuclear localization of I κ B α promotes active transport of NF- κ B from the nucleus to the cytoplasm. *J Cell Sci.* Bd. 110(3): pp. 369-378. 1997.
- [107] S. Ghosh, M. J. May und E. B. Kopp. NF κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol.* Bd. 16: pp. 225-260. 1998.
- [108] F. Mercurio, H. Zhu, B. W. Murray, et al. IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated I κ B kinases essential for NF κ B activation. *Science.* Bd. 278(5339): pp. 860-866. 1997.
- [109] E. Zandi, D. M. Rothwarf, M. Delhase, et al. The I κ B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKK α and IKK β , necessary for I κ B phosphorylation and NF κ B activation. *Cell.* Bd. 91(2): pp. 243-252. 1997.
- [110] J. DiDonato, F. Mercurio, C. Rosette, et al. Mapping of the inducible I κ B phosphorylation sites that signal its ubiquitination and degradation. *Mol Cell Biol.* Bd. 16(4): pp. 1295-1304. 1996.
- [111] A. Yaron, A. Hatzubai, M. Davis, et al. Identification of the receptor component of the I κ B α -ubiquitin ligase. *Nature.* Bd. 396(6711): pp. 590-594. 1998.
- [112] S. Ghosh und M. Karin. Missing pieces in the NF- κ B puzzle. *Cell.* Bd. 109: pp. 81-96. 2002.
- [113] Rice University, Department of Statistics. Rice University Department of Statistics. [Online]. Available: <http://www.stat.rice.edu/~siefert/Research/NfKB.html>. [Zugriff am 2019].
- [114] L. Ling, Z. Cao und D. V. Goeddel. NF κ B-inducing kinase activates IKK- α by phosphorylation of Ser-176. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Bd. 95(7): pp. 2791-2797. 1998.
- [115] R. J. Grumont, I. J. Rourke, L. A. O'Reilly, et al. B lymphocytes differentially use the Rel and nuclear factor κ B1 (NF- κ B1) transcription factors to regulate cell cycle progression and apoptosis in quiescent and mitogen-activated cells. *J Exp Med.* Bd. 187(5): pp. 663-674. 1998.
- [116] S. Akira und T. Kishimoto. NF-IL6 and NF- κ B in cytokine gene regulation. *Adv Immunol.* Bd. 65: pp. 1-46. 1997.
- [117] Z. Han, D. L. Boyle, A. M. Manning und G. S. Firestein. AP-1 and NF- κ B regulation in rheumatoid arthritis and murine collagen-induced arthritis. *Autoimmunity.* Bd. 28(4): pp. 197-208. 1998.
- [118] C. Monaco und E. Paleolog. Nuclear factor κ B: a potential therapeutic target in atherosclerosis and thrombosis. *Cardiovasc Res.* Bd. 61(4): pp. 671-682. 2004.
- [119] B. Bonetti, C. Stegagno, B. Cannella, et al. Activation of NF- κ B and c-jun transcription factors in multiple sclerosis lesions. Implications for oligodendrocyte pathology. *Am J Pathol.* Bd. 155(5): pp. 1433-1438. 1999.
- [120] M. Karin und F. R. Greten. NF- κ B: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol.* Bd. 5(10): pp. 749-759. 2005.
- [121] Q. Li, S. Withoff und I. M. Verma. Inflammation-associated cancer: NF- κ B is the lynchpin. *Trends Immunol.* Bd. 26(6): pp. 318-325. 2005.
- [122] P. C. Rath. Relationship between constitutive nuclear factor- κ B (NF- κ B) and inhibitor κ B- α (I κ B- α) in an interferon- α -sensitive human Burkitt lymphoma cell line. *Biochim Biophys Acta.* Bd. 1741(3): pp. 253-263. 2005.

- [123] L. Mansouri, N. Papakonstantinou, S. Ntoufa, et al. NF- κ B activation in chronic lymphocytic leukemia: A point of convergence of external triggers and intrinsic lesions. *Semin Cancer Biol.* Bd. 39: pp. 40-48. 2016.
- [124] D. S. Lind, S. N. Hochwald, J. Malaty, et al. Nuclear factor-kappa B is upregulated in colorectal cancer. *Surgery.* Bd. 130(2): pp. 363-369. 2001.
- [125] P. C. Cogswell, D. C. Guttridge, W. K. Funkhouser und A. S. Baldwin Jr. Selective activation of NF-kappa B subunits in human breast cancer: potential roles for NF-kappa B2/p52 and for Bcl-3. *Oncogene.* Bd. 19(9): pp. 1123-1131. 2000.
- [126] M. Karin. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature.* Bd. 441(7092): pp. 431-436. 2006.
- [127] K. S. Ahn und B. B. Aggarwal. Transcription factor NF-kappaB: a sensor for smoke and stress signals. *Ann N Y Acad Sci.* Bd. 1056: pp. 218-233. 2005.
- [128] D. C. Guttridge, C. Albanese, J. Y. Reuther, et al. NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol Cell Biol.* Bd. 19(8): pp. 5785-5799. 1999.
- [129] U. Novak, B. G. Cocks und J. A. Hamilton. A labile repressor acts through the NFkB-like binding sites of the human urokinase gene. *Nucleic Acids Res.* Bd. 19(12): pp. 3389-3393. 1991.
- [130] J. Sottile. Regulation of angiogenesis by extracellular matrix. *Biochim Biophys Acta.* Bd. 1654(1): pp. 13-22. 2004.
- [131] W.-C. Huang, S.-T. Chan, T.-L. Yang, et al. Inhibition of ICAM-1 gene expression, monocyte adhesion and cancer cell invasion by targeting IKK complex: molecular and functional study of novel alpha-methylene-gamma-butyrolactone derivatives. *Carcinogenesis.* Bd. 25(10): pp. 1925-1934. 2004.
- [132] Y. Ueda und A. Richmond. NF-kappaB activation in melanoma. *Pigment Cell Res.* Bd. 19(2): pp. 112-124. 2006.
- [133] R. J. Collins, L. A. Verschuer, B. V. Harmon, et al. Spontaneous programmed death (apoptosis) of B-chronic lymphocytic leukaemia cells following their culture in vitro. *Br J Haematol.* Bd. 71(3): pp. 343-350. 1989.
- [134] J. Hombach, T. Tsubata, L. Leclercq, et al. Molecular components of the B-cell antigen receptor complex of the IgM class. *Nature.* Bd. 343(6260): pp. 760-762. 1990.
- [135] J. M. Dal Porto, S. B. Gauld, K. T. Merrell, et al. B cell antigen receptor signaling 101. *Mol Immunol.* Bd. 41(6-7): pp. 599-613. 2004.
- [136] C. C. Goodnow, C. G. Vinuesa, K. L. Randall, et al. Control systems and decision making for antibody production. *Nat Immunol.* Bd. 11(8): pp. 681-688. 2010.
- [137] M. R. Clark, D. Massenburg, K. Siemasko, et al. B-cell antigen receptor signaling requirements for targeting antigen to the MHC class II presentation pathway. *Curr Opin Immunol.* Bd. 16(3): pp. 382-387. 2004.
- [138] T. Kurosaki, H. Shinohara und Y. Baba. B cell signaling and fate decision. *Annu Rev Immunol.* Bd. 28: pp. 21-55. 2010.
- [139] P. C. Cheng, B. K. Brown, W. Song und S. K. Pierce. Translocation of the B cell antigen receptor into lipid rafts reveals a novel step in signaling. *J Immunol.* Bd. 166(6): pp. 3693-3701. 1999.
- [140] T. Kurosaki. Genetic analysis of B cell antigen receptor signaling. *Annu Rev Immunol.* Bd. 17: pp. 555-592. 1999.

- [141] K. W. Harder, L. M. Parsons, J. Armes, et al. Gain- and loss-of-function Lyn mutant mice define a critical inhibitory role for Lyn in the myeloid lineage. *Immunity*. Bd. 15(4): pp. 603-615. 2001.
- [142] V. Rolli, M. Gallwitz, T. Wossning, et al. Amplification of B cell antigen receptor signaling by a Syk/ITAM positive feedback loop. *Mol Cell*. Bd. 10(5): pp. 1057-1069. 2002.
- [143] C. Fu, C. W. Turck, T. Kurosaki und A. C. Chan. BLNK: a central linker protein in B cell activation. *Immunity*. Bd. 9(1): pp. 93-103. 1998.
- [144] T. Okada, A. Maeda, A. Iwamatsu, et al. BCAP: the tyrosine kinase substrate that connects B cell receptor to phosphoinositide 3-kinase activation. *Immunity*. Bd. 13(6): pp. 817-827. 2000.
- [145] D. J. Hodsdon und M. Turner. The role of PI3K signaling in the B cell response to antigen. *Adv Exp Med Biol*. Bd. 633: pp. 43-53. 2009.
- [146] P. Antony, J. B. Petro, G. Carlesso, et al. B cell receptor directs the activation of NFAT and NF-kappaB via distinct molecular mechanisms. *Exp Cell Res*. Bd. 291(1): pp. 11-24. 2003.
- [147] M. Pontoriero, G. Fiume, E. Vecchio, et al. Activation of NF-kB in B cell receptor signaling through Bruton's tyrosine kinase-dependent phosphorylation of Ikb-a. *J Mol Med*. Bd. 97(5): pp. 675-690. 2019.
- [148] A. Hashimoto, H. Okada, A. Jiang, et al. Involvement of guanosine triphosphatases and phospholipase C-gamma2 in extracellular signal-regulated kinase, c-Jun NH2-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase activation by the B cell antigen receptor. *J Exp Med*. Bd. 188(7): pp. 1287-1295. 1998.
- [149] D. K. Mohammad, B. F. Nore und E. C. I. Smith. Terminating B cell receptor signaling. *Oncotarget*. Bd. 8(66): pp. 109857-109858. 2017.
- [150] E. Ingley. Src family kinases: regulation of their activities, levels and identification of new pathways. *Biochim Biophys Acta*. Bd. 1784(1): pp. 56-65. 2008.
- [151] Y. Herishanu, P. Perez-Galan, D. Liu, et al. The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. Bd. 117(2): pp. 563-574. 2011.
- [152] A. Contri, A. M. Brunati, L. Trentin, et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells contain anomalous Lyn tyrosine kinase, a putative contribution to defective apoptosis. *J Clin Invest*. Bd. 115(2): pp. 369-378. 2005.
- [153] S. Gobessi, L. Laurenti, P. G. Longo, et al. Inhibition of constitutive and BCR-induced Syk activation downregulates Mcl-1 and induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leukemia*. Bd. 23(4): pp. 686-697. 2009.
- [154] M. Muzio, B. Apollonio, C. Scielzo, et al. Constitutive activation of distinct BCR-signaling pathways in a subset of CLL patients: a molecular signature of anergy. *Blood*. Bd. 112(1): pp. 188-195. 2008.
- [155] S. Hewamana, S. Alghazal, T. T. Lin, et al. The NF-kappaB subunit Rel A is associated with in vitro survival and clinical disease progression in chronic lymphocytic leukemia and represents a promising therapeutic target. *Blood*. Bd. 111(9): pp. 4681-4789. 2008.
- [156] A. Petlickovski, L. Laurenti, X. Li, et al. Sustained signaling through the B-cell receptor induces Mcl-1 and promotes survival of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*. Bd. 105(12): pp. 4820-4827. 2005.
- [157] F. K. Stevenson, S. Krysov, A. J. Davies, et al. B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. Bd. 118(16): pp. 4313-4320. 2011.

- [158] J. A. Burger und N. Chiorazzi. B cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Trends Immunol.* Bd. 34(12): pp. 592-601. 2013.
- [159] E. ten Hacken, M. Sivina, E. Kim, et al. Functional differences between IgM and IgD signaling in chronic lymphocytic leukemia. *J Immunol.* Bd. 197(6): pp. 2522-2531. 2017.
- [160] I. C. Mockridge, K. N. Potter, I. Wheatley, et al. Reversible anergy of sIgM-mediated signaling in the two subsets of CLL defined by VH-gene mutational status. *Blood.* Bd. 109(10): pp. 4424-4431. 2007.
- [161] K. Stamatopoulos, C. Belessi, C. Moreno, et al. Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: Pathogenetic implications and clinical correlations. *Blood.* Bd. 109(1): pp. 259-270. 2007.
- [162] A. Wiestner, A. Rosenwald, T. S. Barry, et al. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood.* Bd. 101(12): pp. 4944-4951. 2003.
- [163] M. Suljagic, L. Laurenti, M. Tarnani, et al. Reduced expression of the tumor suppressor PHLPP1 enhances the antiapoptotic B-cell receptor signal in chronic lymphocytic leukemia B-cells. *Leukemia.* Bd. 24(12): pp. 2063-2071. 2010.
- [164] M. S. Cragg, C. H. T. Chan, M. D. Fox, et al. The alternative transcript of CD79b is overexpressed in B-CLL and inhibits signaling for apoptosis. *Blood.* Bd. 100(9): pp. 3068-3076. 2002.
- [165] S. T. Abrams, T. Lakum, K. Lin, et al. B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia cells is regulated by overexpressed active protein kinase Cbeta1. *Blood.* Bd. 109: pp. 1193-1201. 2007.
- [166] K. Murphy und C. Weaver. Immunologie. Berlin: Springer Spektrum. 2018.
- [167] G. Voisinne, A. G. de Peredo und R. Roncagalli. CD5, an undercover regulator of TCR signaling. *Front Immunol.* Bd. 9: p. 2900. 2018.
- [168] T. Dragovic Ivancevic, N. Kraguljac Kurtovic, V. Knezevic, et al. The role of immunophenotyping in differential diagnosis of chronic lymphocytic leukemia. *Srp Arh Celok Lek.* Bd. 142(3-4): pp. 197-203. 2014.
- [169] A. Werner, E. Amann, V. Schnitzius, A. Habermeier, C. Luckhner-Minden, N. Leuchtner, J. Rupp, E. I. Closs und M. Munder. Induced arginine transport via cationic amino acid transporter-1 is necessary for human T-cell proliferation. *Eur J Immunol.* Bd. 46(1): pp. 92-103. 2016.
- [170] The Royal Society of Chemistry. The half-lives of 248 quantified cell-surface N-glycoproteins. [Online]. Available: www.rsc.org/suppdata/c6/sc/c6sc01814a/c6sc01814a12.xlsx. [Zugriff am Dezember 2020].
- [171] K. S. Aulak, J. Liu, J. Wu, et al. Molecular sites of regulation of expression of the rat cationic amino acid transporter gene. *J Biol Chem.* Bd. 271(47): pp. 29799-806. 1996.
- [172] S. K. Muther. Dissertation: Regulation der Genexpression des humanen kationischen Aminosäuretransporters hCAT-1. Mainz. 2017.
- [173] A. Yeomans, S. M. Thirdborough, B. Valle-Argos, et al. Engagement of the B-cell receptor of chronic lymphocytic leukemia cells drives global and MYC-specific mRNA translation. *Blood.* Bd. 127(4): pp. 449-457. 2016.
- [174] A. Wiestner. The role of B-cell receptor inhibitors in the treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica.* Bd. 100(12): pp. 1495-1507. 2015.

- [175] A. R. Mato, M. Thompson, J. N. Allan, et al. Real-world outcomes and management strategies for venetoclax-treated chronic lymphocytic leukemia patients in the United States. *Haematologica*. Bd. 103(9): pp. 1511-1517. 2018.
- [176] S. M. Morris Jr. Arginine metabolism revisited. *J Nutr*. Bd. 146(12): pp. 2579S-2586S. 2016.
- [177] O. Warburg. On the origin of cancer cells. *Science*. Bd. 123(3191): pp. 309-314. 1956.
- [178] T. B. Salisbury und S. Arthur. The regulation and function of the L-type amino acid transporter 1 (LAT1) in cancer. *Int J Mol Sci*. Bd. 19(8): p. 2373. 2018.
- [179] S. Bröer. Amino acid transporters as targets for cancer therapy: Why, where, when, and how. *Int J Mol Sci*. Bd. 21(17): p. 6156. 2020.
- [180] G. Shin, T.-W. Kang, S. Yang, et al. GENT: gene expression database of normal and tumor issues. *Cancer Inform*. Bd. 10: pp. 149-157. 2011.
- [181] K. Hayashi und N. Anzai. Novel therapeutic approaches targeting L-type amino acid transporters for cancer treatment. *World J Gastrointest Oncol*. Bd. 9(1): pp. 21-29. 2017.
- [182] M. Yue, J. Jiang, P. Gao, et al. Oncogenic MYC activates a feedforward regulatory loop promoting essential amino acid metabolism and tumorigenesis. *Cell Rep*. Bd. 21: pp. 3819-3832. 2017.
- [183] J.-W. Kim, K. I. Zeller, Y. Wang, et al. Evaluation of myc E-box phylogenetic footprints in glycolytic genes by chromatin immunoprecipitation assays. *Mol Cell Biol*. Bd. 24(13): pp. 5923-5936. 2004.
- [184] K. M. Grzes, M. Swamy, J. L. Hukelmann, et al. Control of amino acid transport coordinates metabolic reprogramming in T-cell malignancy. *Leukemia*. Bd. 31(12): pp. 2771-2779. 2017.
- [185] J. K. Tomblin, S. Arthur, D. A. Primerano, et al. Aryl hydrocarbon receptor (AHR) regulation of L-type amino acid transporter 1 (LAT-1) expression in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells. *Biochem Pharmacol*. Bd. 106: pp. 94-103. 2016.
- [186] Q. Wang, C. G. Bailey, J. Tiffen, et al. Androgen receptor and nutrient signaling pathways coordinate the demand for increased amino acid transport during prostate cancer progression. *Cancer Res*. Bd. 71: pp. 7525-7536. 2011.
- [187] A. Elorza, I. Soro-Arnaiz, F. Melendez-Rodriguez, et al. HIF2alpha acts as an mTORC1 activator through the amino acid carrier SLC7A5. *Mol Cell*. Bd. 48(5): pp. 681-691. 2012.
- [188] C. G. Hansen, Y. L. Dora, W.-L. Macrina, et al. The hippo pathway effectors YAP and TAZ promote cell growth by modulating amino acid signaling to mTORC1. *Cell Res*. Bd. 25(12): pp. 1299-1313. 2015.
- [189] P. Pantham, F. J. Rosario, S. T. Weintraub, et al. Down-regulation of placental transport of amino acids precedes the development of intrauterine growth restriction in maternal nutrient restricted baboons. *Biology of Reproduction*. Bd. 95(5): pp. 1-9. 2016.
- [190] S. Ohtsuki, H. Yamaguchi, Y.-S. Kang, et al. Reduction of L-type amino acid transporter 1 mRNA expression in brain capillaries in a mouse model of Parkinson's disease. *Biol Pharm Bull*. Bd. 33(7): pp. 1250-1252. 2010.
- [191] A. Rotmann, A. Simon, U. Martine, A. Habermeier und E. I. Closs. Activation of classical protein kinase C decreases transport via systems y+. *Am J Physiol Cell Physiol*. Bd. 292: pp. C2259-C2268. 2007.

- [192] P. Gräf, U. Förstermann und E. I. Closs. The transport activity of the human cationic amino acid transporter hCAT-1 is downregulated by activation of protein kinase C. *Br J Pharmacol.* Bd. 132: pp. 1193-1200. 2001.
- [193] K. Y. Krotova, S. I. Zharikov und E. R. Block. Classical isoforms of PKC as regulators of CAT-1 transporter activity in pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* Bd. 284: pp. L1037-L1044. 2003.
- [194] K. Jäger, U. Bönisch, M. Risch, et al. Detection and regulation of cationic amino acid transporters in healthy and diseased ocular surface. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* Bd. 50: pp. 1112-1121. 2009.
- [195] B. K. Zhang, A. M. Moran, C. G. Bailey, et al. EGF-activated PI3K/Akt signalling coordinates leucine uptake by regulating LAT3 expression in prostate cancer. *Cell Communication and Signaling.* Bd. 17(1): p. 83. 2019.
- [196] C. Moret, M. H. Dave, N. Schulz, et al. Regulation of renal amino acid transporters during metabolic acidosis. *Am J Physiol Renal Physiol.* Bd. 292(2): pp. F555-F566. 2006.
- [197] M. K. Pinho, J. S. Amaral, V. Pinto, et al. Regulation of renal LAT2 and 4F2hc expression by aldosteron. *Journal of Epithelial Biology & Pharmacology.* Bd. 2: pp. 36-43. 2009.
- [198] T. Ivancevic, N. Kurtovic, V. Knezevic, Bogdanovic A, B. Mihaljevic, B. Bozic und M. Gotic. The role of immunophenotyping in differential diagnosis of chronic lymphocytic leukemia. *Srp Arh Celok Lek.* Bd. 142: pp. 197-203. 2014.

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich während der Erstellung meiner Dissertation unterstützten und ermutigten und so zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen.

Mein besonderer Dank [REDACTED], der mich während meiner praktischen Arbeit im Labor und auch während der schriftlichen Phase stets außerordentlich unterstützte. Er war ein sehr zuverlässiger Ansprechpartner und gab mir wertvolle Anregungen und Hilfestellungen. Die regelmäßigen Treffen mit der ausführlichen Besprechung und Diskussion meiner Ergebnisse gaben mir stets hilfreiche Anregungen für meine weiteren Experimente. Ich habe mich zu jeder Zeit meiner Arbeit sehr gut betreut gefühlt.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei [REDACTED] bedanken, die mir als direkte Ansprechpartnerin im Labor und als sehr erfahrene Wissenschaftlerin stets zur Seite stand, mit mir Fragen und Probleme diskutierte und mich in alle Methoden einarbeitete. Sie hatte immer ein offenes Ohr für alle Fragen, die während der Arbeit im Labor und auch während der schriftlichen Phase auftraten.

Des Weiteren bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern [REDACTED] [REDACTED]. Mit ihrer Hilfsbereitschaft motivierten sie mich immer wieder und standen mir mit Humor und Herzlichkeit zur Seite.

Nicht zuletzt gilt der Dank meinen Eltern, die mich nicht nur während dieser Arbeit sondern auch während meiner gesamten schulischen und akademischen Ausbildung jederzeit unterstützt haben und denen ich daher diese Dissertation widmen möchte.

10 Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name	Wildenberg
Vorname	Niklas Philipp
Anschrift	[REDACTED]
Nationalität	Deutschland
Geburtsdatum	02.05.1995
Geburtsort	Heppenheim
Telefon	[REDACTED]
E-Mail	[REDACTED]

Ausbildung

August 2001 – Juni 2005	Christophorus-Schule Unter-Hambach, Heppenheim
August 2005 – Juni 2013	Starkenburger-Gymnasium, Heppenheim (Endnote: 1,1)
Oktober 2013 – Juni 2021	Studium der Humanmedizin an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz (Endnote: 1,83)
	Praktisches Jahr (Mai 2020 – April 2021)
	Tertial 1: Innere Medizin, Klinikum Innenstadt, Ludwig-Maximilian-Universität München
	Tertial 2: Chirurgie, Asana Spital Menziken, Schweiz
	Tertial 3: Pädiatrie, Landeskrankenhaus Bregenz, Österreich

Forschung

März 2018 – April 2019	Freie Semester im Rahmen meiner medizinischen Doktorarbeit bei [REDACTED], III. Medizinische Klinik der Universitätsmedizin Mainz
------------------------	---

Präsentationen

April 2019	Vortrag mit dem Titel „Regulation of cationic amino acid transporter-1 (CAT-1) expression in CLL cells“ beim Forschungsmeeting der III. Medizinischen Klinik, Universitätsmedizin Mainz, 04/2019
April 2021	Präsentation meiner Dissertationsarbeit auf dem Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin (DGIM), 04/2021

Stipendium

Peter-Scriba-Promotionsstipendium der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin (DGIM)